

CHARAKTERISIERUNG
EINES AUS EINEM WELLENSITTICH
(MELOPSITTACUS ONDULATUS)
ISOLIERTEN PARAMYXOVIRUS

Erna Engelhard

1982

Aus der Klinik für Innere Krankheiten der Tiere
Lehrstuhl für Krankheiten des Hausgeflügels,
der Zier- und Zoovögel
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München,
Vorstand: Prof. Dr. Josef Kösters

Die Arbeit wurde unter der Leitung von
Prof. Dr. Irmgard Gylstorff angefertigt.

CHARAKTERISIERUNG EINES AUS EINEM WELLENSITTICH
(MELOPSITTACUS ONDULATUS) ISOLIERTEN PARAMYXOVIRUS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Erna Engelhard
aus Aschaffenburg
München 1982

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. G. Terplan
Referent: Prof. Dr. I. Gylstorff
Korreferent: Prof. Dr. H. Mahnel

Tag der Promotion: 26. Februar 1982



Christoph & Michael
HOFBAUER
drucken + binden
Adalbertstrasse 18
8000 München 40

INHALT

1. Einleitung

2. Die Bedeutung der Musik im Leben

3. Die Musik als Kunst

4. Die Musik als Wissenschaft

5. Die Musik als Religion

6. Die Musik als Philosophie

7. Die Musik als Politik

8. Die Musik als Wirtschaft

9. Die Musik als Kultur

10. Die Musik als Wissenschaft

11. Die Musik als Kunst

12. Die Musik als Wissenschaft

13. Die Musik als Religion

14. Die Musik als Philosophie

15. Die Musik als Politik

16. Die Musik als Wirtschaft

17. Die Musik als Kultur

18. Die Musik als Wissenschaft

19. Die Musik als Kunst

20. Die Musik als Wissenschaft

21. Die Musik als Religion

22. Die Musik als Philosophie

23. Die Musik als Politik

24. Die Musik als Wirtschaft

25. Die Musik als Kultur

26. Die Musik als Wissenschaft

27. Die Musik als Kunst

28. Die Musik als Wissenschaft

29. Die Musik als Religion

30. Die Musik als Philosophie

31. Die Musik als Politik

32. Die Musik als Wirtschaft

33. Die Musik als Kultur

34. Die Musik als Wissenschaft

35. Die Musik als Kunst

36. Die Musik als Wissenschaft

37. Die Musik als Religion

38. Die Musik als Philosophie

39. Die Musik als Politik

40. Die Musik als Wirtschaft

Meiner Mutter gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. LITERATUR	2
2.1. Klassifizierung der Paramyxoviren	2
2.2. Aviäre Paramyxoviren	3
2.2.1. Gruppe PMV-1	3
2.2.2. - PMV-2	8
2.2.3. - PMV-3	12
2.2.4. - PMV-4	15
2.2.5. - PMV-5	16
2.2.6. - PMV-6	17
2.2.7. Nicht eingeordnete Paramyxoviren	18
2.3. Methoden zur Isolierung und Charakterisierung von aviären Paramyxoviren	20
2.3.1. Nachweis von Paramyxoviren durch Eikultur	20
2.3.2. Nachweis von Paramyxoviren durch Zellkultur	20
2.3.3. Allgemeine Charakterisierung von Paramyxoviren	21
2.3.4. Serologische Identifizierung	22
2.3.5. Differenzierung von Einzelisolaten	23
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	26
3.1. Material	26
3.1.1. Virusisolat	26
3.1.2. Referenzstämme	27
3.1.3. Referenzseren	28
3.1.4. Kultursysteme	28
3.1.4.1. Embryonierte Hühnereier	28
3.1.4.2. Embryonierte Hühner-, Enten- und Gänseeier	29
3.1.4.3. Hühner- und Moschusentenembryofibroblasten	30
3.1.4.4. Küken- und Schweinenierenzellen	30
3.2. Methoden	31
3.2.1. Virusvermehrung in embryonierten Hühner-, Enten- und Gänseeiern	31
3.2.1.1. Impfmethode und Kontrolle des Infektionsverlaufs	31
3.2.1.2. Bestimmung von Virustiter und MDT	31
3.2.1.3. Hämagglutinations- und Elutionsversuche	32
3.2.2. Virusvermehrung in der Zellkultur	32
3.2.2.1. Titerbestimmung und Hämadsorptionstest	33
3.2.2.2. Plaquetest	33
3.2.2.3. Färbung der Kulturen auf CPE und Einschlußkörperchen	35
3.2.3. Physikalisch-chemische Untersuchungen	36
3.2.3.1. Tenazität	36
3.2.3.2. Bestimmung der Nukleinsäure	36
3.2.3.3. Untersuchung der Neuraminidaseaktivität	37

	Seite
3.2.3.4. Hämolysetest	38
3.2.3.5. Größenschätzung nach Filtration	38
3.2.3.6. Elektronenmikroskopische Untersuchung	39
3.2.4. Serologische Untersuchungen	39
3.2.4.1. Hämagglutinationshemmungstest	39
3.2.4.2. Agargelpräzipitationstest	40
3.2.4.3. Neutralisationstest	40
3.2.4.4. Plaquereduktionstest	41
3.2.5. Tierversuche	41
3.2.5.1. Bestimmung des ICPI beim Eintagsküken	41
3.2.5.2. Bestimmung der Pathogenität für achtwöchige Hühner	42
3.2.5.3. Bestimmung der Pathogenität für adulte Wellensittiche	42
4. ERGEBNISSE	44
4.1. Wachstumsverhalten des Isolates	44
4.1.1. Verhalten in der Eikultur	44
4.1.2. Verhalten in der Zellkultur	45
4.1.3. Hämagglutination, HämadSORPTION und Elution	46
4.2. Physikalisch-chemische Eigenschaften	49
4.2.1. Tenazität	49
4.2.2. Eigenschaften von Hüllantigenen und Nukleinsäure	50
4.2.3. Größe und Morphologie der Viruspartikel	52
4.3. Serologische Eigenschaften	54
4.3.1. Hämagglutinationshemmungstest	54
4.3.2. Agargelpräzipitationstest	55
4.3.3. Neutralisationstest	56
4.4. Pathogenitätstest	57
4.4.1. Eintagsküken	57
4.4.2. Achtwöchige Hühner	57
4.4.3. Wellensittiche	58
5. DISKUSSION	60
6. ZUSAMMENFASSUNG	64
7. SUMMARY	66
8. LITERATURVERZEICHNIS	68

Definitionen verwendeter Abkürzungen

AAF	Amnion-Allantois-Flüssigkeit
AGP	Agargelpräzipitation
AH	Allantoishöhle
CAM	Chorionallantoismembran
CPE	cytopathischer Effekt
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DS	Dottersack
EID ₅₀	Eiinfektiöse Dosis 50
ELD ₅₀	Eiletale Dosis 50
FHE	Hühnerembryofibroblasten
HA	Hämagglutination
HAH	Hämagglutinationshemmung
JUDR	Joddesoxyuridin
KID ₅₀	Kulturinfektiöse Dosis 50
MDT	mean death time
NDV	Newcastle Disease Virus
nm	Nanometer
o.b.B.	ohne besonderen Befund
PBS	Phosphor Buffered Saline
p.i.	post infectionem
RNS	Ribonukleinsäure
SA	Schnellagglutination
SN	Serumneutralisation
SPF	spezifisch pathogen frei
U/min.	Umdrehungen pro Minute
VVNDV	velogen viscerotropes Newcastle Disease Virus
ZNS	Zentralnervensystem
μ	Mikrometer



Digitized by the Internet Archive
in 2026

1. EINLEITUNG

Der Wellensittich (*Melopsittacus odulatus*) ist einer der am häufigsten in Gefangenschaft gehaltenen Ziervögel. Dementsprechend oft wird er heute dem Tierarzt als Patient vorgestellt.

Von April 1979 bis April 1980 gelang die Isolierung von hämagglutinierenden Viren aus Organmaterial von ca. 30 Wellensittichen, die dem Institut für Hausgeflügel, Zier- und Zoovögel in Oberschleißheim eingesandt worden waren. In der zweiten Eikulturpassage trat meistens zwischen dem zweiten und fünften Tag p. i. eine gehäufte Embryomortalität auf. Eine Kontamination durch Bakterien, Pilze oder Mykoplasmen konnte ausgeschlossen werden. Serologische Kreuzreaktionen mit Antikörpern gegen ND-Virusstämme bzw. Parainfluenza II-Viren (Stamm Stuttgart), nicht aber gegen Influenzaviren, sicherten zunächst die Diagnose: Paramyxovirus. Da in den letzten Jahren wiederholt über neue Untergruppen von Paramyxoviren aviärer Herkunft berichtet wurde, lag es nahe, die Wellensittichisolate genauer zu untersuchen.

Für die vorliegende Arbeit wurde einige Isolate ausgewählt, die aus zwei Zuchtbeständen stammten, die gehäuft Todesfälle zu beklagen hatten. Aufgrund umfangreicher serologischer Untersuchungen und Pathogenitätsteste bei Hühnern wurden drei von vier Isolaten dem velogen viscerotropen Pathotyp des Virus der Newcastle Krankheit zugeordnet. Ein Isolat wies keine serologische Verwandtschaft zu NDV auf. Dieses ist mit der Tagebuchnummer 657 bezeichnete Virus ist Gegenstand der folgenden Arbeit.

2. LITERATUR

2.1. Klassifizierung von Paramyxoviren

Die Paramyxoviren sind charakterisiert durch einen helikal symmetrischen Aufbau des Nukleokapsids, das RNS enthält und von einer Lipo-Protein-Hülle mit Spikes umgeben ist. Letztere sind Sitz der beiden spezifischen Antigene, der Neuraminidase und des Hämagglutinins. Die Vermehrung des Virions erfolgt im Zytoplasma der Wirtszelle mittels RNS-Transskriptase. Die Hülle wird von der Zellmembran gebildet. Als große (100–300 nm) behüllte Viren sind die meisten Paramyxoviren empfindlich gegen organische Lösungsmittel, saures Milieu, UV-Strahlen und hohe Temperaturen. Bei niedrigen Temperaturen (-70°C) und trockener Umgebung überleben sie jahrelang (ROLLE u. MAYR, 1978).

Das Internationale Komitee für Taxonomie der Viren unterteilte die Familie der Paramyxoviridae nochmals in drei Gruppen. Danach gibt es Paramyxoviren (NDV, Parainfluenzaviren und verwandte Erreger), Morbilliviren (Erreger von Masern, Staupe und Rinderpest) und Pneumoviren (respiratorisches Synzitialvirus und ähnliche), wobei nur die echten Paramyxoviren beide Hüllantigene besitzen (FENNER, 1976).

Seit 1960 wuchs die Zahl der aviären Paramyxovirusisolate ohne serologische Verwandtschaft zum NDV beträchtlich, so daß diese 1979 von TUMOVA et al. und 1980 von SHORTRIDGE et al. aufgrund ihrer serologischen Kreuzreaktionen in sechs Gruppen PMV-1 bis PMV-6 unterteilt wurden. In Anlehnung an die Nomenklaturregelung für Influenzaviren (WHO EXPERT COMMITTEE, 1971) werden jetzt Einzelisolate mit dem englischen Namen für die Vogelart, dem Fundort und dem Fundjahr gekennzeichnet. Zusätzlich wird, wenn vorhanden, ein Eigenname hinzugesetzt (z.B. PMV-2 chicken/California/Yucaipa/56). Über die sechs aviären Untergruppen des Paramyxovirus liegen die folgenden Kenntnisse vor.

2.2. Aviäre Paramyxoviren

2.2.1. Gruppe PMV-1

Diese Gruppe besteht aus den zahlreichen Varianten des seit 1927 bekannten Erregers der Newcastlekrankheit, der für die Nutzgeflügelhaltung aufgrund der ausgelösten wirtschaftlichen Schäden von besonderer Bedeutung ist. Erstmals wurde von KRANEVALD (1926) über die Krankheit aus Java berichtet. Das Virus wurde von DOYLE (1927) in England isoliert, wohin die Krankheit auf dem Seeweg eingeschleppt worden war. Dieser erste Seuchenausbruch in Europa in Newcastle-on-Tyne war durch eine hohe Morbidität und Letalität (bis 100 %) der infizierten Hühner gekennzeichnet. Die klinischen Symptome waren die einer akuten Kreislaufstörung. Die Krankheit führte nach wenigen Tagen zum Tod. Es folgten in grösseren Abständen weitere verlustreiche Epidemien in England, Kleinasien und im zweiten Weltkrieg in großen Teilen Europas. Um 1940 trat in Kalifornien eine milde verlaufende, als Pneumoencephalitis bezeichnete, Hühnerkrankheit mit respiratorischen und nervösen Erscheinungen auf. Ihr Erreger wurde 1944 von BEACH als Variante des ND-Virus erkannt und beschrieben.

Heute ist die Newcastlekrankheit auf der gesamten Erde verbreitet und kommt bei Hühnern in vier Pathotypen vor. Es gibt lentogene (apathogene) Stämme, die als Impfviren Verwendung finden und mesogene Stämme, die bei erwachsenen Tieren nur ein mildes Krankheitsbild hervorrufen. Außerdem gibt es velogene (hochpathogene) Varianten, die entweder neurotrop sind und massive ZNS-Störungen mit protrahiertem Krankheitsverlauf verursachen oder viscerotrop sind und respiratorische bzw. digestorische Symptome mit akutem Krankheitsverlauf hervorrufen. Beiden Formen gemeinsam ist eine hohe Morbidität und Letalität bei Hühnern aller Altersklassen (LANCASTER u. ALEXANDER, 1975; HANSON, 1978). Die vom Erregertyp, Alter und Immunstatus abhängige klinische und pathomorphologische Symptomatik der Seuche beim Huhn ist gut untersucht und seit langem bekannt.

Auch andere Hausgeflügelarten zeigen sich für NDV empfänglich. Dabei nimmt die Resistenz in der Reihenfolge Pute, Taube, Ente, Gans zu (DOYLE, 1927; HANSON, 1964). Auch durch velogene Stämme werden hier meist nur vorübergehende ZNS-Störungen und selten Todesfälle verursacht (ROLLE u. MAYR, 1978). SHORTRIDGE et al. fanden 1980 bei 67 von 2000 klinisch gesunden Enten und Gänsen atypische ND-Stämme. Weitere ND-Isolate wurden aus Zier- und Wildvogelarten gewonnen. Klinisch gesunde Träger des NDV waren zahlreiche Vertreter der Gattung Passeriformes (LÜTHGEN, 1973; SLEMONS et al., 1973). ERICKSON et al. gelang 1975 bei gesunden Vögeln der Gattungen Fringillidae (Finken), Sturnidae (Stare) und Psittacidae (Papageien) der Nachweis von ND-Viren verschiedener Pathotypen. Später infizierte er sechs verschiedene Ziervogelarten, und zwar Wellensittiche, Kanarienvögel (*Serinus canarius*), Gelbscheitelamazonen (*Amazona oncrocephala oratrix*), Schwarzkopfnonnen (*Lonchura malacca*), kleine Beos (*Gracula religiosa indica*) und Elfenbeinsittiche (*Aratinga canicularis eburnirostrum*), mit einem Psittazidenstamm (Amazona/Colorado) des VVNDV. Die einzelnen Arten zeigten sehr unterschiedliche Reaktionen. Ziemlich unempfindlich waren die Kanarienvögel, von denen nur wenige Tiere erkrankten und starben. Von den Beos starben 20 % ohne klinische Symptome. Deutliche Krankheitserscheinungen mit ZNS-Störungen traten bei den Elfenbeinsittichen, den Amazonen und den Wellensittichen auf. Letztere zeigten mit einer Morbidität von 100 % und einer Letalität von 22 % eine hohe Empfänglichkeit für die Krankheit. Überlebende Vögel hatten im HAH-Test hohe Antikörpertiter. Veränderungen im Digestions-trakt wie bei den Hühnern konnten bei keiner Vogelspezies gesehen werden (ERICKSON et al., 1977).

Ferner berichteten ERICKSON et al. (1978) über eine interessante Pathogenitätsänderung des ND-Isolates Amazona/Colorado im Anschluß an die Passagen durch die Ziervögel. Bei wiederholter Passage durch empfängliche Hühnerküken erwies sich das Virus dann stets als nur noch schwach pathogen für Hühner. In der Zellkultur konnte kein Auftreten roter Plaques mehr festgestellt werden. Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen stehen

die verheerenden Seuchenzüge in Hühnerbeständen, die nach Importen von mit NDV infizierten Amazonen 1970 in Kalifornien auftraten (HANSON, 1973).

LÜTHGEN berichtete 1981 von Infektionsversuchen mit VVNDV an Bergpapageien (*Agapornis taranta*), von denen 30 % starben, ohne Symptome gezeigt zu haben. In diesem Versuch erwiesen sich Alexandersittiche (*Psittacula eupatria nipalensis*) als unempfindlich gegen das gleiche Virus. Dagegen starben von den Halsbandsittichen (*Psittacula crameri*), den Pflaumenkopfsittichen (*Psittacula cyanocephala*) und den Wellensittichen alle erkrankten Tiere plötzlich, wobei bei den Wellensittichen deutliche ZNS-Störungen vorangingen. Letztere zeigten auch die höchste Empfänglichkeit für die Newcastlekrankheit. Pathologisch-anatomisch fiel das Fehlen von ausgeprägten Veränderungen auf. Wegen des schnellen Krankheitsverlaufs war der Ernährungszustand der Tiere noch gut. Relativ häufig traten eine Milzhypertrophie und Blutungen in der pneumatisierten Spongiosa der Schädeldecke auf. Histologisch konnte eine nichteitrige Enzephalitis auch bei Tieren ohne klinische Symptome nachgewiesen werden.

Allgemein stellte LÜTHGEN (1981) aufgrund umfangreicher Untersuchungen fest, daß afrikanische Psittaziden selten an ND erkranken. Bei den südamerikanischen und australischen Papageienarten soll die akute, schnell zum Tode führende Form vorherrschen, während asiatische Arten mehr protrahiert und weniger oft tödlich erkranken. Impfungen auf verschiedenem Wege mit einer handelsüblichen Hühnervaccine hatten außer bei Wellensittichen eine gute Schutzwirkung in gefährdeten Beständen (LÜTHGEN, 1981).

Spontanes Auftreten der Newcastlekrankheit bei Ziervögeln wurden 1962 aus Indonesien, 1966 aus dem Iran und 1970 aus Europa und den U.S.A. berichtet (HANSON, 1973). Auch in Deutschland wurden durch frischimportierte Großpapageien mehrfach für Hühner hochpathogene ND-Stämme eingeschleppt, die sich in den Quarantänestationen rasch ausbreiteten und zu hohen Verlusten führten (LÜTHGEN u. WACHENDÖRFER, 1970; LÜTHGEN, 1981).

Seltener sind Berichte über das Vorkommen von PMV-1 Viren bei Greifvögeln. ARIAS-IBARRONDO et al. isolierten 1978 aus einem japanischen Sperber ein hämagglutinierendes Agens mit serologischer Verwandtschaft zum ND-Virus, das für Hühner außerordentlich pathogen war. WINTEROLL berichtete 1976 über die Empfänglichkeit von Turmfalken (*Falco tinnunculus*), Bussarden (*Buteo buteo*), Waldkäuzen (*Stix aluco*), Waldohreulen (*Asio otus*) und Schleiereulen (*Tyto alba*) für den velogenen ND-Stamm Italien. Diese Tiere starben alle und zeigten regelmäßig deutliche ZNS-Störung, insbesondere Lähmungen der Gliedmaßen. Pathologisch-anatomisch trat bei allen Tieren auch eine Milzschwellung auf. Zugleich beschreibt WINTEROLL die regelmäßige Isolierung von ND-Varianten bei Greifvögeln und Eulen aus der freien Wildbahn, die dem Institut für Hausgeflügel, Zier- und Zoo-vögel in Oberschleißheim zur Sektion zugesandt worden waren.

In der Eikultur war das Wachstum der ND-Stämme aus den verschiedenen Vogelspezies in der Regel sowohl in Hühner- als auch in Enten- und Gänse-embryonen gut. Allerdings wurde vielfach eine Adaptierung an das Hühnerei nötig. Es kam dabei abhängig vom Pathotyp zum mehr oder weniger schnellen Embryotod, wobei nur die CAM-Inokulation das Absterben des Embryos verzögerte und zu kleinen Nekroseherden auf der CAM führte (HANSON, 1975; HANSON, 1978).

Das Verhalten einiger PMV-1 Viren in Zellkulturen wurde von BANKOWSKI (1964) von ALEXANDER et al. (1973) und von HANSON (1978) beschrieben. ND-Viren wuchsen dabei in allen gebräuchlichen Säugetier- und Vogelzellen. In der Intensität ihres Wachstums ergaben sich erhebliche Unterschiede, während eine Bevorzugung bestimmter Zellarten nur selten beobachtet wurde. Apathogene Stämme verursachten regelmäßig nur einen schwachen CPE oder benötigten den Zusatz von Mg-Ionen und DEAE (Diethylaminoethyl-dextran) im Medium zur Bildung sichtbarer Plaques (HANSON, 1975). Pathogene ND-Stämme dagegen erzeugten einen typischen CPE mit großen Riesenzellen und rascher Zellzerstörung. Die Plaques entstanden spontan und waren ziemlich groß. Vor allem Isolate aus exotischen Vögeln bildeten

neben klaren auch rot gefärbte Plaques. Zytoplasmatische Einschlusskörperchen konnten nicht regelmäßig nachgewiesen werden (BANKOWSKI, 1965; ALEXANDER et al., 1973; HANSON, 1978).

Bei allen Viren der Gruppe PMV-1 konnten die für Paramyxoviren charakteristischen Eigenschaften beobachtet werden. Im Elektronenmikroskop sahen sie einheitlich aus. Die beiden Hüllantigene waren regelmäßig vorhanden. Individuelle Differenzen innerhalb der Gruppe 1 traten bei der Hämagglutination und Hämolyse von Erythrozyten verschiedener Tierspezies und bei der Elutionsgeschwindigkeit auf. Ebenso variierte die Stabilität von Hämagglutinin und Neuraminidase gegen äußere Einflüsse (HANSON, 1978; LANCASTER, 1977; ALEXANDER et al., 1970; ALEXANDER, 1980; LANCASTER u. ALEXANDER, 1975; ALLEN et al., 1973 und 1978).

Die serologische Verwandtschaft im HAH-Test war in der Gruppe 1 im allgemeinen groß, wobei hier zwei in Italien neu isolierte Stämme MA/35 und MD-110 aus dem Rahmen fielen. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über einige Ergebnisse dieses Testes. Die neuraminidasenhemmenden Antikörper gegen verschiedene ND-Stämme zeigten bereits deutliche Abweichungen der Antigenstrukturen auf, wobei SCHLOER et al. (1975) nachwiesen, daß Antigendifferenzen zweier Stämme nicht zwangsläufig Unterschiede hinsichtlich der Hämagglutinine und der Neuraminidasen bedeuten müssen. Vielmehr kann ein Hüllantigen bei mehreren Stämmen identisch sein. Über das NDV liegen noch zu wenig Kenntnisse vor, um eine definitive Aussage über Antigenkombinationen und ständige Mutationen innerhalb der Untergruppen machen zu können (WEBSTER et al., 1972).

PENNINGTON et al. (1978) beschrieben nach kinetischen Neutralisationstests in der Zellkultur und doppelter Immunodiffusion (O-Agarose) keine serologischen Unterschiede der neutralisierenden Antigen-Antikörper-Systeme zwischen einigen ND-Stämmen. Dabei ließ sich keine nähere Beziehung zu bestimmten Pathotypen erkennen. Die Immunitätsbildung im Versuchstier wurde durch die serologischen Differenzen der Stämme nicht beeinflusst.

ALEXANDER u. COLLINS (1980) bestätigten Abweichungen in der Polypeptidstruktur der o.g. Isolate MA/35 und MC 110, hielten aber die Zuordnung zur Gruppe 1 wegen vorhandener anderer Übereinstimmungen für gerechtfertigt.

Bei der Untersuchung neuer, vor allem von exotischen Vögeln stammender ND-Isolate gab es häufig ungewöhnliche serologische Reaktionen, die auf der heterogenen Zusammensetzung zurückgeführt wurden. Gelang die Trennung in einzelne Virusklone, so schwankte ihr Verhalten erheblich. Daraus ergab sich eine immer größer werdende Variationsbreite innerhalb der Gruppe PMV-1 (GOMEZ-LILLO u. BANKOWSKI, 1974; HANSON, 1975; SCHLOER et al., 1975).

2.2.2. Gruppe PMV-2

Die erste Veröffentlichung über ein Virus der Unterfamilie Paramyxovirus bei Vögeln, das nicht mit dem ND-Virus verwandt war, erschien 1960 von BANKOWSKI et al.. Das Virus wurde 1956 in Yucaipa, Kalifornien, aus Junghennen zugleich mit dem Virus der Infektiösen Laryngotracheitis isoliert. Die Tiere erkrankten mit schweren respiratorischen Symptomen. In den Beständen traten hohe Verluste auf. BANKOWSKI u. CORSTVET klassifizierten das Yucaipa genannte Isolat 1961 als Paramyxovirus.

WILSON et al. wiesen 1964 seine serologische Eigenständigkeit nach. BANKOWSKI et al. berichteten 1968 von einem regelmäßigen Vorkommen in chicken/California/Yucaipa/56 bei weitgehend gesunden Hühnern und Puten in den U.S.A.. Auch in Kanada wurde das Yucaipa Virus von LANG et al. (1975) aus Putenbeständen isoliert. Bei der gleichen Tierart gelang es KINKEID et al. (1979) in Israel einen mit Yucaipa verwandten Erreger zu isolieren, der turkey/Israel/79 benannt wurde und in einigen Herden erhebliche Verluste verursachte. Weitere Isolate von Hühnern meldeten ISACHENKO et al. (1975) aus der UDSSR.

Wildlebende, klinisch gesunde Vögel der Gattung Passeriformes beherbergten häufig Yucaipa-ähnliche Viren (STARKE et al., 1977; NYMADAWA

et al., 1977; TUMOVA et al., 1979). Ein in der DDR aus einem Rotkelchen gewonnenes Isolat enthielt den Namen robin/Hiddensee/77. Ähnliche Funde bei einigen Webervögeln in West-Afrika werden durch das Virus weaver/Senegal/PLOC/77 repräsentiert (FLEURY u. ALEXANDER, 1978; FLEURY u. ALEXANDER, 1979).

Zur Gruppe PMV-2 gehört trotz einiger serologischer Abweichungen auch das Isolat finch/N. Ireland/Bangor/73, das von McFERRAN et al. (1974) aus den Organen eines exotischen Finken (*Uranginthus angolensis*) isoliert wurde. Ein mit diesem verwandtes Virus stammte aus einem frisch nach England importierten Graupapagei und wurde als parrot/England/0121/74 bezeichnet (COLLINGS et al., 1975). Beide Tiere waren noch in der Quarantänestation gestorben.

Allen Vertretern der Gruppe 2 gemeinsam war das Fehlen einer primären Pathogenität für Eintagsküken, sechs Wochen alte Küken und erwachsenen Puten (BANKOWSKI u. CORSTVET, 1961; McFERRAN et al., 1974; COLLINGS et al., 1975). Schwere respiratorische Erscheinungen wurden bei Huhn und Pute nur festgestellt, wenn gleichzeitig andere Erreger in der Herde vorhanden waren, wobei das Yucaipa Virus als wegbereitender Faktor auftrat (BANKOWSKI, 1960; LANG et al., 1975; LIPKIND et al., 1979). Nur bei jungen Puten konnte das Yucaipa Virus alleine schwere Verluste hervorrufen. Bei dem Seuchenausbruch in Israel zeigten die betroffenen Jungtiere vornehmlich Sinusitis und Konjunktivitis, seltener Pneumonien. Die Letalität betrug bei einer Morbidität von 100 % bis zu 90 %. In den letztgenannten Fällen wurden nur selten Sekundärerreger isoliert (LIPKIND et al., 1979). Berichte von LANG et al. (1975) aus kanadischen Beständen enthalten ähnliche Beobachtungen. Die genesenden Tiere wiesen im HAH-Test hohe Antikörpertiter auf.

Finch/N. Ireland/Bangor/73 rief eine tödliche Erkrankung des Wirtsvogels hervor, wobei genauere Angaben über das Krankheitsbild und den Sektionsbefund fehlen. Über experimentelle Infektionen von Finken und über die Pathogenität für andere Vogelarten liegen keine Berichte vor (McFERRAN et al., 1974). Parrot/England/0212/74 verursachte den Tod einer größeren

Anzahl von Graupapageien. Die klinischen Symptome bestanden hauptsächlich in einer zunehmenden Schwäche der Tiere. Pathologisch-anatomisch lagen Anzeichen einer Pneumonie mit vermehrtem Schleim in der Trachea vor (COLLINGS et al., 1975). Die bereits erwähnten Wildvogelisolats stammten ausschließlich von Kotproben gesunder Tiere. Außer an Hühnern wurde ihr Pathogenitätsverhalten nicht getestet (FLEURY u. ALEXANDER, 1979; NYMADAWA et al., 1977; TUMOVA et al., 1979 a).

Im embryonierten Hühnerei ließen sich alle Viren der Gruppe PMV-2 gut vermehren, führten aber nicht regelmäßig zum Embryotod und benötigten dazu meist über 100 Stunden. Die bevorzugte Inokulationsmethode war bei allen Autoren die Allantoishöhlenbeimpfung. Für Yucaipa wurde von BANKOWSKI (1960) über eine Adaptierung an das Hühnerei nach zwei Passagen berichtet. Über das Verhalten in Eikulturen anderer Vogelarten sowie bei variierender Inokulationsmethode ist nichts bekannt (BANKOWSKI, 1960; BANKOWSKI u. CORSTVET, 1961; McFERRAN et al., 1974; COLLINGS et al., 1975; FLEURY u. ALEXANDER, 1979; TUMOVA et al., 1979 a).

Ein Wachstum in FHE-Kulturen wurde für Yucaipa von ALEXANDER et al. (1979) beschrieben. BANKOWSKI (1960) und DINTER (1964) züchteten das gleiche Virus erfolgreich in Hühnernieren-, Affennieren- und Schweinenierenzellen. Finch/N.Ireland/Bangor/73 und weaver/Senegal/PLOC)) wuchsen ebenfalls in FHE- und Hühnernierenzellkulturen (McFERRAN et al., 1974; FLEURY u. ALEXANDER, 1978). Der in den verschiedenen Zellsystemen auftretende CPE gleicht, soweit mitgeteilt, dem der wenig virulenten ND-Stämme. Es kamen nur kleine Riesenzellen mit bis zu zehn Kernen vor und der Zellrasen wurde nicht völlig zerstört (ALEXANDER et al., 1979 b). Über eine Plaquesbildung von Viren der Gruppe 2 wurde nicht berichtet. Ebenso wie die Vertreter der Gruppe PMV-1 zeigten die Isolate von PMV-2 die typischen Eigenschaften der Paramyxoviren sowie eine sehr einheitliche Morphologie. Es bestanden jedoch individuelle Besonderheiten im physikalisch-chemischen Verhalten der Hüllantigene sowie in der Hitze-stabilität der infektiösen Aktivität (COLLINGS et al., 1975 ; BROSTROM

et al., 1971). Die von ALEXANDER (1980) zusammengestellten Ergebnisse verschiedener Autoren zeigten allerdings für das gleiche Virus erhebliche Abweichungen der Werte, was wohl durch die Anwendung von nicht standardisierten Methoden zu erklären ist. Das Hämagglutinationsmuster mit Erythrozyten verschiedener Spezies wurde nur für Bangor und Yucaipa von KESSLER et al. (1979) untersucht. Beide Viren reagierten positiv mit roten Blutkörperchen von Huhn, Pute, Taube, Meerschwein und Mensch und negativ mit solchen von Schaf, Rind und Pferd.

Das Antigenverhalten der Viren aus der Gruppe PMV-2 mit Kreuz-HAH-Test ist aus Tabelle 1 ersichtlich. Die Ergebnisse decken sich nach Untersuchungen von COLLINGS et al. (1975), ALEXANDER u. CHETTLE (1978) und TUMOVA et al. (1979) mit denen des Neutralisationstestes. Allerdings war durch diesen Test nur eine geringe Verwandtschaft zwischen Bangor und Yucaipa nachzuweisen. Dies sprach für eine Aufteilung von PMV-2 in zwei Untergruppen. Die hämagglutinationshemmenden Antikörper der beiden zuletzt erwähnten Viren zeigten eine beidseitige schwache serologische Verwandtschaft. Während die übrigen Isolate dieser Gruppe häufig eine asymmetrische, nur in eine Richtung deutlich ausgeprägte Kreuzreaktion mit Yucaipa aufwiesen (ALEXANDER, 1980). Die Isolate turkey/Israel/79 und robin/Hiddensee/77 ließen sich dennoch mit einiger Sicherheit als mit dem Yucaipa Virus eng verwandt bezeichnen. Die Viren weaver/Senegal/PLOC/77 und parrot/England/0212/74 waren einander sehr ähnlich und gehörten nach ihrem serologischen Verhalten zu der Untergruppe, die vom Bangor Virus repräsentiert wird. ALEXANDER u. CHETTLE (1978) berichteten allerdings einmal von einer sehr engen Verwandtschaft der Hämagglutinine von Bangor und Yucaipa, zugleich aber von erheblichen Abweichungen in den Neuraminidasen. Die Gruppe PMV-2 zeigte also eine serologische Inhomogenität. Die Analyse der Polypeptidstrukturen von ALEXANDER u. COLLINS (1981) ergab hingegen ein weitgehend einheitliches Bild, so daß die Einordnung in eine gemeinsame Serogruppe gerechtfertigt erscheint. Von gesicherten Kreuzreaktionen mit einer der anderen fünf Gruppen wurde nicht berichtet (ALEXANDER, 1980).

2.2.3. Gruppe PMV-3

Hier eingeordnet sind die Viren turkey/Wisconsin/68 und turkey/Ontario/67, die von vielen Autoren als identisch angesehen wurden. Bereits 1967 und in den folgenden Jahren isolierte LANG diese Stämme zusammen mit Yucaipa ähnlichen Erregern aus kanadischen Putenbeständen, in denen die Tiere an Atemwegserkrankungen litten. Die Veröffentlichung dieser Funde aus Kanada und den U.S.A. erfolgte erst durch TUMOVA et al. (1979b).

Mit diesen Viren verwandt ist ein von SMIT u. RONDHUIS (1976) aus dem Gehirn eines Schönsittichs (*Neophema pulchella*) isoliertes Agens, das parakeet/Netherlands/449/75 benannt wurde. ALEXANDER u. CHETTLE (1978) wiesen seine Zugehörigkeit zur Gruppe 3 nach.

Serologisch gehörte auch das Isolat lovebird/New York/78 dazu, das aus einem verendeten Rosenköpfchen (*Agapornis roseicollis*) stammt und von HITCHNER u. HIRAI (1979) eingehend beschrieben wurde. Weitere Vertreter von PMV-3 wurden in England entdeckt (ASHTON u. ALEXANDER, 1980). Sie stammten aus in Quarantäne gestorbenen Vögeln und zwar aus zwei nicht näher bezeichneten Finken, einem Nymphensittich (*Nymphicus hollandicus*) und einem Alexandersittich. Eines der Isolate erhielt den Namen: parakeet/England/78.

Die Pathogenität dieser Gruppe wurde nur teilweise untersucht. Turkey/Wisconsin/68 rief bei Puten nur milde Krankheitserscheinungen der Atemwege hervor (TUMOVA et al., 1979b). Beide o.g. Putenstämme erwiesen sich nach Berichten von ALEXANDER u. CHETTLE (1978) als apathogen für Hühner jeden Alters. Das Isolat parakeet/Netherlands/449/75 verursachte bei verschiedenen Psittaziden (vor allem bei *Neophema*-arten und Rosellas) ZNS-Störungen, wie Torticollis, Tremor und Lähmungen der Gliedmaßen. Bei hoher Morbidität war die Letalität außer bei Singsittichen (*Psephotus haematonotus*) gering. Es erkrankten auch einige Vertreter der Gattung Passeriformes, wie Kanarienvögel, Gouldsamadinen (*Chloebea gouldia*) und einigen Weberfinken. Als nicht empfänglich für das Virus erwiesen

sich Wellen- und Nymphensittiche sowie Japanwachteln. Entenküken und Tauben erkrankten ebenfalls nicht, bildeten aber Antikörper gegen dieses Parakeet-Isolat. Der ICPI beim Eintagsküken lag mit 1,3 sehr hoch, bei älteren Hühnerküken und erwachsenen Tieren wurden jedoch keine Erkrankungen mehr festgestellt. Alle infizierten Hühner hatten hohe Titer hämagglutinationshemmender Antikörper (SMIT u. RONDHUIS, 1976). Das Virus lovebird/New York/78 wurde für den Tod von 200 aus 300 Agaporniden in einer Importstation verantwortlich gemacht. Bevor die Tiere starben, litten sie einige Tage lang an grünlichem, wässrigem Durchfall. Bei Japanwachteln trat ebenfalls eine Diarrhoe auf, ohne daß es zu Verlusten kam. Eintagsküken, Junghühner und Wellensittiche blieben nach experimenteller Infektion ohne klinische Symptome, wiesen jedoch einen deutlichen Antikörperanstieg auf (HITCHNER u. HIRAI, 1979; HIRAI et al., 1979).

Ein Wachstum im embryonierten Hühnerei, in der Regel nach AH-Inokulation, wurde bei allen Viren der Gruppe 3 nachgewiesen. Bei dem Isolat turkey/Wisconsin/68 waren einige Passagen bis zur Adaptierung an das Hühnerei nötig. Sowohl bei Infizierung mit parakeet/Netherlands/449/75 als auch mit lovebird/New York/78 starben nicht alle Embryonen ab. Der Tod trat meist 60 bis 100 Stunden p.i. ein. Nur für das Lovebird-Virus wird von Embryoveränderungen wie Milzschwellungen und Lebernekrosen sowie von kleinen Verdichtungsherden auf der CAM berichtet (HITCHNER u. HIRAI, 1979; TUMOVA et al., 1979 b; SMIT u. RONDHUIS, 1976).

In den FHE-Kulturen verursachten parakeet/Netherlands/449/75 und turkey/Wisconsin/68 einen CPE, der durch kleine Riesenzellen, Vakuolenbildung und langsame Zelllysis gekennzeichnet war (ALEXANDER et al., 1979 b). Für das Parakeet-Isolat wurde von SMIT u. RONDHUIS (1976) auch die Züchtung in Hühnernierenzellen und Entenembryofibroblasten beschrieben. Es bildete in diesen Zellen deutliche, mittelgroße, farblose Plaques. Das Lovebird-Virus wuchs in Hühnernierenzellen mit ausgeprägter Synzytienbildung und zytoplasmatischen Einschußkörperchen. In FHE-Kulturen erfolgte kein Wachstum (HIRAI et al., 1979).

Über weitere Züchtungsversuche und das Plaquebildungsvermögen der anderen Isolate liegen keine Literaturangaben vor.

Hinsichtlich der Eigenschaften, die für alle Paramyxoviren typisch sind, zeigten die PMV-3-Viren keine Abweichungen. Die vorliegenden Untersuchungen ergaben keine elektronenoptischen Unterschiede der Virusmorphologie (COLLINGS et al., 1975; SMIT u. RONDHUIS, 1976; ALEXANDER u. CHETTLE, 1978; TUMOVA et al., 1979 b; HIRAI et al., 1979). Über geringe individuelle Abweichungen der Stabilität von Hämagglutinin und Neuraminidase zwischen turkey/Wisconsin/68 und parakeet/Netherlands/449/75 wurde von COLLINGS et al. (1975) und ALEXANDER u. CHETTLE (1978) berichtet. Das letztgenannte Virus agglutinierte Erythrozyten von Rind, Pferd, Meerschwein, Huhn und Mensch (SMIT u. RONDHUIS, 1976). Hämagglutinationsmuster der übrigen Isolate der Gruppe 3 sind nicht bekannt.

Aus Tabelle 1 sind die Kreuzreaktionen im HAH-Test innerhalb der Gruppe sowie gegenüber anderen aviären Paramyxoviren zu ersehen. Dabei sind die beiden Putenisolate nicht mehr getrennt aufgeführt, da sie als ein Stamm angesehen wurden (McFERRAN et al., 1974). Parakeet/Netherlands/449/75 erwies sich als deutlich verwandt mit turkey/Wisconsin/68. Ein auffälliges Merkmal beider Viren war eine geringgradige serologische Verwandtschaft mit dem NDV (ALEXANDER u. CHETTLE, 1978; ALEXANDER, 1980). Die übrigen Psittazidenisolate dieser Gruppe reagierten mit dem Isolat parakeet/Netherlands/449/75 stärker als mit dem Putenstamm. Im Neuraminidasehemmtest wurden diese Ergebnisse von ALEXANDER u. CHETTLE (1978), soweit es die Reaktion mit NDV betrifft, bestätigt. Dagegen ergab sich hinsichtlich der Neuraminidasen eine engere Verwandtschaft zwischen dem Parakeet-Virus und turkey/Wisconsin/68 als zwischen diesem und turkey/Ontario/67. Dieses Ergebnis sprach allerdings für eine serologische Trennung der Putenisolate innerhalb der Gruppe PMV-3. Kreuzreaktionen mit anderen aviären Paramyxoviren wurden darüberhinaus nicht beobachtet (ALEXANDER, 1980).

Die serologischen Untersuchungen wurden von ALEXANDER (1979.a) durch Versuche ergänzt, Hühner mit einigen Paramyxoviren gegen die Newcastle-Krankheit zu immunisieren. Dabei zeigten die Isolate turkey/Wisconsin/68 und parakeet/Netherlands/449/75 bei empfänglichen Junghennen eine gute Schutzwirkung gegen die Infizierung mit dem hochpathogenen ND-Stamm Herts 33, die mit der durch den Impfstamm B1 vergleichbar war. Mit dem homologen Antikörpertiter stieg nach dem Infektionsversuch bei den PMV-3 Viren auch der zu Beginn schwache ND-Antikörpertiter steil an. Der gleiche Versuch mit Vertretern von PMV-2 und PMV-4 verlief negativ (ALEXANDER, 1979 a).

Die Erforschung der Polypeptidstrukturen von Viren der Gruppe 3 durch ALEXANDER u. COLLINS (1981) ergab eine weitgehende Übereinstimmung der Parakeet-Stämme, eine leichte Abweichung von den Putenisolaten und das Fehlen von zwei Polypeptiden bei dem Virus lovebird/New York/78.

Die größere Einheitlichkeit der Gruppe 3 wurde durch das beschränkte Wirtsspektrum erklärt. Das besondere Charakteristikum dieser PMV-3 Viren lag in ihrer Pathogenität für Eintagsküken und der gegenüber den übrigen aviären Paramyxoviren ausgeprägteren Beziehung zum NDV (ALEXANDER, 1980).

2.2.4. Gruppe PMV-4

Im Rahmen eines in den Jahren 1975 bis 1977 in Hongkong durchgeführten Influenza-Untersuchungsprogrammes fand man in Schleimhautabstrichen gesunder Vögel verschiedener Herkunft 27 verwandte Paramyxoviren. Virus-träger waren hauptsächlich Enten und Gänse (SHORTRIDGE u. ALEXANDER, 1978). Das später duck/HongKong/D3/75 benannte Isolat wurde dabei erstmals differenziert. Es zeigte keine Antigenbeziehung zu anderen bekannten Vogel- und Säugerparamyxoviren (ALEXANDER et al., 1979).

In den U.S.A. wurden aus Organen geschossener Wildenten neben bisher unbekannten Influenza-Stämmen eine Reihe von Paramyxovirusisolaten gewonnen, die alle in die Gruppe 4 eingeordnet werden konnten. Eines der Isolate erhielt die Bezeichnung duck/Mississippi/406/75 (WEBSTER et al., 1979).

Alle Wirtstiere erschienen klinisch gesund. Eintagsküken und drei Wochen alte Küken erkrankten nach experimenteller Infizierung mit duck/HongKong/D3/75 nicht. Angaben über weitere Pathogenitätstests liegen nicht vor (SHORTRIDGE u. ALEXANDER, 1978).

Alle Isolate in der Gruppe 4 wuchsen ohne Adaptierung nach AH-Inokulation im embryonierten Hühnerei. Das Wachstum von duck/HongKong/D3/75 war nach Berichten von ALEXANDER et al. (1979 b) in Hühnernierenzellen ausgeprägter als in FHE-Kulturen, wobei in beiden Fällen der typische CPE aus kleinen Synzytialzellen bestand.

Das Verhalten der beiden Hüllantigene der Entenisolate wies leichte Abweichungen auf. Im übrigen entsprachen die Isolate hinsichtlich aller physikalisch-chemischen und morphologischen Eigenschaften den Paramyxoviren. Das Virus duck/HongKong/D3/75 hämagglutinierte Erythrozyten von Huhn und Pferd (KESSLER et al., 1979; ALEXANDER et al., 1979 b; SHORTRIDGE u. ALEXANDER, 1978).

Trotz der weit von einander entfernten Fundorte ergab der HAH-Test der einzelnen Stämme der Gruppe PMV-4 keine signifikanten Unterschiede (siehe Tab. 1). Sowohl der Neuraminidasetest als auch ein Vergleich der Polypeptidstrukturen bestätigte die große Homogenität dieser Serogruppe (ALEXANDER et al., 1979 a; ALEXANDER u. COLLINS, 1980).

2.2.5. Gruppe PMV-5

Zu dieser Gruppe gehören ausschließlich Wellensittichisolate, die in Japan gefunden wurden. Die wichtigsten Vertreter dieser Viren sind budgerigar/Japan/Kunitachi/74 und budgerigar/Japan/TI/75.

Nach natürlicher wie nach experimenteller Infektion litten alle betroffenen Wellensittiche an einer akuten, meist tödlich verlaufenden Krankheit. Die klinischen Symptome waren Durchfall und Atemnot, seltener auch Torticollis. Histologisch fielen multiple Nekrosen in Leber und Niere mit Riesenzellbildung auf. Die Letalität betrug bis zu 100 % (NEROME et al., 1978;

NAKAYAMA et al., 1976; YOSHIDA et al., 1977). Über eine Pathogenität der PMV-5 Stämme für Hühner ist nichts bekannt.

Das Kunitachi Virus und seine Verwandten unterschieden sich nicht nur serologisch von allen bisher bekannten Paramyxoviren. Vielmehr wuchsen die Isolate im embryonierten Hühnerei nur nach Inokulation in die Amnionhöhle und zeigten nur in gereinigter AAF eine konstante Hämagglutination der Erythrozyten von Huhn, Ente, Gans, Meerschwein und Mensch. In FHE-Kulturen war bei budgerigar/Japan/Kunitachi/74 ein gutes Wachstum mit Ausbildung eines für die schwach pathogenen ND-Stämme typischen CPE zu beobachten (NEROME et al., 1978).

Morphologie und physikalisch-chemische Eigenschaften der Viren der Gruppe 5 entsprachen einander. Auch gegenüber anderen Paramyxoviren ergaben sich insoweit keine Differenzen (NEROME et al., 1978; YOSHIDA et al., 1977). Im HAH-Test erwiesen sich alle Wellensittichisolate als eng verwandt (ALEXANDER, 1980). Mit Viren der anderen fünf Serogruppen traten keine Kreuzreaktionen auf (Tab. 1).

2.2.6. Gruppe PMV-6

Diese von SHORTRIDGE (1980) beschriebene Gruppe umfaßt verschiedene Entenisolate wie duck/HongKong/199/77, duck/HongKong/334/78, duck/HongKong/445/78 und ein Hühnerisolat namens chicken/HongKong/54/78. Die klinisch gesunden Wirtsvögel stammten aus Geflügelfarmen in Hongkong und der Volksrepublik China. Alle beschriebenen Isolate waren apathogen für Hühner jeden Alters.

In der AH des embryonierten Hühnereies wuchsen die PMV-6 Viren gut. Über das Auftreten von kleinen Riesenzellen und einer wenig ausgeprägten Zellerstörung in Hühnerembryofibroblasten- und Hühnernierenkulturen wurde berichtet (SHORTRIDGE, 1980).

Alle Stämme dieser Gruppe waren einander serologisch sehr ähnlich, aber verschieden von den bisher bekannten aviären Paramyxoviren. Die Analyse der Polypeptidstrukturen ergab ebenfalls eine große Einheitlichkeit von PMV-6

(ALEXANDER, 1980; ALEXANDER u. COLLINS, 1981).

2.2.7. Nicht eingeordnete aviäre Paramyxoviren

Aufgrund der beschriebenen Viruseigenschaften gehören noch eine Reihe von aviären Isolaten zur Familie der Paramyxoviren deren Zuordnung zu einer der bisher beschriebenen Serogruppen nicht vollzogen wurde.

WAGNER u. ENDERS-RUCKLE (1966) berichteten über das Vorkommen von mit Parainfluenza II Viren, Typ Hongkong, des Menschen verwandten Erregern. Diese Viren wurden aus bebrüteten Hühnereiern isoliert, die von Zucht- und Legebetrieben in der BRD stammten. Serologisch konnte eine weite Verbreitung in Geflügelhaltungen vor allem in den Herbstmonaten nachgewiesen werden (WOERNLE et al., 1971; WAGNER u. KÖSTERS, 1965). In Stuttgart gelang WOERNLE et al. (1971) die Isolierung von zwei Subtypen, Stuttgart I und II. Beide Viren erwiesen sich als apathogen für Hühner. NUMAZAKI et al. (1968) entdeckten in Japan ebenfalls Parainfluenza II Subtypen bei Hühnern. Bei allen Autoren wurde eine Kontamination mit humanen Virusstämmen durch das Betreuungspersonal nicht ausgeschlossen. Die regelmäßige Züchtung von Parainfluenza II, Stuttgart, in der Eikultur gelang erst nach acht bis zehn Blindpassagen in der Amnionhöhle des Hühnerembryos. Die Fähigkeit Erythrozyten vom Huhn zu agglutinieren war häufig nicht konstant und ging nach kurzer Zeit wieder verloren (WOERNLE et al., 1971). Serologische Beziehungen der Parainfluenza II Stämme zum NDV wurden von McFERRAN et al. (1974) beschrieben.

In Japan fanden KIDA u. YANAGAWA (1979) bei einer wildlebenden Felsen- taube (*Columba livia*) das Virus pigeon/Japan/Otaru/76. Für Haustauben war das Isolat nicht pathogen. Eine Rückisolierung des Virus und der Nachweis von Antikörpern gelang nicht. Die Empfänglichkeit anderer Vögel wurde nicht getestet. Bei der Untersuchung gesunder Wildtauben entdeckten die Autoren bei sechs Tieren einen positiven Antikörpertiter gegen pigeon/

Japan/Otaru/76.

Auffällig an dem Isolat war die für Paramyxoviren ungewöhnliche Hitze-stabilität des Hämagglutinins (keine Zerstörung nach 24 Std. bei 56°C). Ein Wachstum im embryonierten Hühnerei bei AH-Beimpfung wurde festgestellt. In FHE- Kulturen traten nur vereinzelt Riesenzellen sowie eine positive Hämadsorption auf. KIDA u. YANAGAWA (1979) berichteten von einer serologischen Kreuzreaktion auf sehr niedrigem Niveau mit Vertretern der Gruppen PMV-1, -2, -3 und -5.

Seit 1972 ist in Australien ein Paramyxovirus vom Wellensittich namens budgerigar/Queensland/PMAM-1/72 bekannt, das MUSTAFFA-BABJEE et al. (1974) beschrieben.

Zur gleichen Zeit wurde eine ähnliche Erkrankung bei einigen Loris (*Trichoglossus haematodus*), die Kontakt mit infizierten Wellensittichen gehabt hatten, beobachtet (MUSTAFFA-BABJEE u. SPRADBORROW, 1973). Experimentell infizierte Hühner und Tauben erkrankten nicht, bildeten aber Antikörper gegen das Wellensittichisolat aus. Über 50 % der Wellensittiche starben hingegen nach kurzer Zeit an unstillbaren Durchfällen. Pathologisch-anatomisch fielen eine Splenomegalie und umfangreiche Hämorrhagien der Vormagen- und Darmschleimhaut sowie Ödeme der Darmwand auf. Überlebende Tiere hatten hohe Antikörpertiter gegen das Virus (MUSTAFFA-BABJEE et al., 1974).

Die Züchtung von budgerigar/Queensland/PMAM-1/72 im embryonierten Hühnerei mittels AH-Beimpfung gelang nicht. Dagegen wuchs das Isolat in Hühnernierenzell- und FHE-Kulturen. Deutlich ausgeprägter war allerdings das Wachstum in Affennierenzellen. Der in allen Zellkulturen sichtbare CPE bestand aus den typischen Riesenzellen und zahlreichen Kern-einschlußkörperchen, die bei den echten Paramyxoviren nicht vorkommen (MUSTAFFA-BABJEE et al., 1974).

Aufgrund der Symptomatik bei den erkrankten Vögeln (akute Enteritis, 50 % Morbidität, 90 % Letalität) und der fehlenden Hämagglutination in ungereinigter AAF erscheint eine Verwandtschaft mit dem Kunitachi Virus

(PMV-5) wahrscheinlich. Ergebnisse eines HAH-Tests mit Seren gegen andere Paramyxoviren wurden nicht veröffentlicht. Im Neutralisationstest ergab sich keine Verwandtschaft mit NDV, Yucaipa-, Masern- und Staupeviren. (MUSTAFA-BABJEE et al., 1974).

2.3. Methoden der Isolierung und Charakterisierung von aviären Paramyxoviren

2.3.1. Nachweis von Paramyxoviren durch Eikultur

Paramyxoviren können ohne Ausnahme im embryonierten Hühnerei vermehrt werden. Am besten wachsen sie in der Regel bei AH-Inokulation in acht bis zehn Tagen alten, bebrüteten Eiern. Dabei werden die äußeren Veränderungen des Embryos und seiner Hüllen sowie die Todesrate beurteilt. Die mittlere Todesrate, innerhalb der bei höchster Verdünnung noch alle Embryonen regelmäßig absterben, gibt Aufschluß über die Pathogenität für Hühnerembryonen. Hautrötungen, Blutungen unter die Schädelkalotte und ein Blutstau in allen Organen des Embryos kommen zwar regelmäßig vor, sie sind aber nicht pathognomisch für die Paramyxoviren. Nur bei CAM-Inokulation können kleine Verdichtungsherde auf der CAM auftreten (ROLLE u. MAYR, 1978; HITCHNER u. HIRAI, 1979; HANSON, 1975, 1978; MAYR et al., 1977).

Zur Adaptierung von Paramyxoviren des Wellensittichs und des Parainfluenza II Virus vom Huhn war primär eine Vermehrung in der Amnionhöhle des Hühnerembryos erforderlich, ehe diese Isolate auch nach anderen Inokulationsmethoden wuchsen (NEROME et al., 1978; WOERNLE et al., 1971).

Gelegentlich findet eine Virusvermehrung im Hühnerei ohne Veränderungen des Embryos und seiner Hüllen statt. Ein Nachweis ist dann nur mit Hilfe der Hämagglutination von Hühnererythrozyten möglich (MAYR et al., 1977).

2.3.2. Nachweis von Paramyxoviren durch Zellkulturen

Monolayerkulturen eignen sich sowohl zu Vermehrung bekannter als auch zum Nachweis neuer Isolate. Die Paramyxoviren bevorzugen individuell

unterschiedliche Zellen. Am häufigsten wurde über ein gutes Wachstum in FHE und Hühnernierenzellen berichtet (HIRAI et al., 1979; MAYR et al., 1977; HANSON, 1978).

Die meisten Paramyxoviren zeigten als typischen CPE Riesenzellen unterschiedlicher Größe, Vakuolenbildung und eine mehr oder weniger schnelle Zelllysis. Zytoplasmatische Einschlußkörperchen wurden nicht in allen Fällen gefunden. Ein Nachweis des Virus gelang auch bei Fehlen eines deutlichen CPE mit Hilfe der Hämadsorption von Hühnerythrozyten an infizierte Zellen (HITCHNER u. HIRAI, 1979; MAYR et al., 1977; HANSON, 1978; BANKOWSKI, 1960; ALEXANDER et al., 1979b).

Für das NDV entwickelte HANSON (1975) den Plaquetest. Größe und Farbe der Plaques dienten hierbei zur Differenzierung der Pathotypen. Bei anderen Paramyxoviren wurden nur kleine, klare Plaques beobachtet (HANSON, 1978; SCHLOER u. HANSON, 1968; NEROME et al., 1978).

2.3.3. Allgemeine Charakterisierung von Paramyxoviren

Paramyxoviren sind als behüllte Viren empfindlich gegen Lipidlösungsmittel wie Äther und Chloroform. Nach entsprechender Behandlung verlieren sie ihre Infektiosität. Als RNS-Viren werden sie in ihrem Wachstum durch spezifische Hemmstoffe der DNS-Synthese, wie etwa halogenierte Uridine, nicht beeinflusst. Die Hitze- und Säurelabilität ist ein weiteres Charakteristikum aller Paramyxoviren. Sie wird durch den Verlust der Infektiosität nach 30-minütiger Erhitzung auf 56°C oder Säureeinwirkung nachgewiesen (MAYR et al., 1977; HITCHNER u. HIRAI, 1979; ROLLE u. MAYR, 1978).

Diese bisher erwähnten physikalisch-chemischen Eigenschaften sind für eine Reihe anderer Virusgruppen ebenfalls kennzeichnend. Zur näheren Identifizierung dient deshalb der Nachweis der beiden Hüllantigene, des Hämagglutinins und der Neuraminidase. Alle Paramyxoviren agglutinieren und adsorbieren Hühnerythrozyten und zeigen eine deutliche Neuraminidaseaktivität, die photometrisch nachgewiesen werden kann (ROLLE u. MAYR, 1978; HANSON, 1978; MAYR et al., 1977; ALEXANDER, 1980; NEROME et al., 1978).

In der elektronenmikroskopischen Darstellung der Viruspartikel sind die aviären Paramyxoviren übereinstimmend durch das Auftreten pleomorpher Teilchen mit helikaler Innenstruktur und einer Größe von 150-300 nm charakterisiert. Die Hülle mit den Spikes ist gut sichtbar. Gelegentlich kommen heringsgräten-ähnliche Strukturen vor (NEROME et al., 1978; MUSTAFFA-BABJEE et al., 1974; HANSON, 1978).

Die Größe des Viruspartikels kann auch nach Filtration geschätzt werden. Paramyxoviren passieren eine Porengröße von 0,45 μ ohne Verlust der Infektiosität. Bei Poren von 0,22 μ wird ein Teil, bei Poren von 0,1 μ werden alle intakten Virionen zurückgehalten. Aufgrund deren geringer Größe (100 nm) gelingt eine Abtrennung von Influenzaviren (MAYR et al., 1977; ROLLE u. MAYR, 1978). Diesen fehlt im Gegensatz zu Paramyxoviren ferner die Fähigkeit, Erythrozyten von Hühnern zu hämolysieren (NEROME et al., 1978; KIDA u. YANAGAWA, 1979; KESSLER et al., 1979; SHORT-RIDGE et al., 1980).

2.3.4. Serologische Identifizierung

Von den serologischen Methoden zur Differenzierung neugewonnener Isolate sind für aviäre Paramyxoviren der HAH-Test und der Neutralisationstest am gebräuchlichsten (ALEXANDER, 1980).

Der HAH-Test beruht auf der spezifischen Hemmung des Hämagglutinins durch homologe Antikörper und bildet derzeit die Grundlage der Gruppendifferenzierung innerhalb der aviären Paramyxoviren (ALEXANDER, 1980; MAYR et al., 1977).

Der Neutralisationstest kann in Ei- und Zellkulturen durchgeführt werden. Die Wirkung eines Virus auf diese Systeme wird typspezifisch durch ein homologes Antiserum aufgehoben bzw. durch ein verwandtes abgeschwächt. Eine Variante dieses Tests ist der Plaquereduktionstest, der auch partielle Neutralisationsvorgänge durch Verminderung der Plaquezahl in einer Zellkultur quantitativ erfaßbar macht. Er wird vor allem für das NDV angewandt (MAYR et al., 1977; HANSON, 1978).

Der AGP-Test wird als Immunodiffusionstest im Agargelmedium durchgeführt. Bei diesem gruppenspezifischen Verfahren kommt es beim Aufeinandertreffen zweier verwandter Reagenten zur Ausbildung einer oder mehrerer Präzipitationslinien (HORZINEK, 1975; MAYR et al., 1977).

Der als Routinetest für Influenzaviren entwickelte Neuraminidasetest wurde von einigen Instituten auch zur Identifizierung von aviären Paramyxoviren herangezogen. Schwierigkeiten bei der Anwendung dieses Verfahrens bereiten die Referenzseren, die einen hohen Reinheitsgrad aufweisen müssen. Homologe Immunseren hemmen dabei mehr oder weniger stark die Neuraminidaseaktivität eines Virusstammes. Abweichungen der Neuraminidasen bei ähnlichen Hämagglutininen ermöglichen eine weitere Unterteilung der Paramyxovirus-Gruppen PMV-1 bis PMV-6 (ALEXANDER u. CHETTLE, 1978; KESSLER et al., 1979; AYMARD-HENRY et al., 1973; WEBSTER et al., 1976).

2.3.5. Differenzierung von Einzelisolaten

Für neue Virusisolate gelingt auch bei enger serologischer Verwandtschaft mit bereits bekannten Stämmen eine individuelle Abgrenzung durch Eigenschaften, die nicht an die Serogruppe gebunden sind. Solche Merkmale sind die verschiedenen Hämagglutinationsmuster mit Erythrozyten unterschiedlicher Tierspezies (McFERRAN et al., 1974; COLLINGS et al., 1976; SHORT-RIDGE u. ALEXANDER, 1980). Außerdem weichen Hitzestabilität und pH-Optimum von Hämagglutinin und Neuraminidase innerhalb der Serogruppen von einander ab (ALEXANDER et al., 1979; ALEXANDER, 1980). Die Dauer der Elutionszeit liefert ebenfalls Anhaltspunkte für die Differenzierung von Isolaten (SPALATIN et al., 1978; COLLINGS et al., 1976).

2.3.6. Bestimmung der Pathogenität

Für die Darstellung des Wirtsspektrums und der Pathogenität eines Erregers bei den einzelnen Spezies ist das Versuchstier unentbehrlich. Nur die experimentelle Infizierung von Repräsentanten der Spezies, die das Isolat lieferte, gibt Aufschluß über die primäre Pathogenität eines Virus für diese Tierart.

Paramyxoviren, deren Wirkung auf den Wellensittich bisher untersucht wurde, verursachten ein uneinheitliches klinisches Bild bei diesen Vögeln. Für einige Isolate schien der Wellensittich unempfindlich zu sein, während andere wie das NDV massive Krankheitssymptome und hohe Verluste hervorriefen. ZNS-Störungen wurden ebenso beobachtet wie Veränderungen am Respirations- und Digestionstrakt. Die meisten Erkrankungen hatten einen akuten Verlauf. Perakute Todesfälle kamen ebenfalls vor (NEROME et al., 1978; LÜTHGEN, 1981; ERICKSON et al., 1977; MUSTAFFA-BABJEE et al., 1974).

Die Pathogenität für das Huhn wird nach der Methode von HANSON (1975) als ICPI beim Eintagsküken und durch Infizierung von achtwöchigen Küken ermittelt. Von den aviären Paramyxoviren sind, abgesehen vom NDV nur Vertreter der Gruppe PMV-3 nennenswert pathogen für das Eintagsküken. Bei älteren Hühnern konnten durch PMV-2 und PMV-3 Stämme gelegentlich leichte respiratorische Symptome hervorgerufen werden.

Die natürliche Übertragung der Paramyxoviren erfolgt über die Schleimhäute des Respirations- und Digestionstraktes. Dies ist bei der Inokulationsmethode zu berücksichtigen. Lokale Abwehrmechanismen, die durch die parenterale Inokulation ausgeschaltet werden, spielen bei der Ausbildung allgemeiner Krankheitserscheinungen eine erhebliche Rolle. Die intranasale Infizierung kommt den natürlichen Abläufen im Wirtstier am nächsten (MAYR et al., 1977; ROLLE u. MAYR, 1978).

Leider steht als SPF-Versuchstier nur das Huhn zur Verfügung. Trotz intensiver Überprüfung des Gesundheitszustandes anderer Vögel mit Hilfe von Kultur- und Serologiemethoden können mögliche Interaktionen durch latent vorhandene Viren nicht ausgeschlossen werden. Daher muß die Rückisolierung

des verimpften Erregers aus den Organen aller infizierten Tiere versucht werden. Ferner werden am Ende des Versuches alle überlebenden Vögel einem serologischen Test unterzogen. Vom Wellensittich wurde allerdings über eine sehr mangelhafte Antikörperbildung berichtet (LÜTHGEN, 1981). Bei Jungtieren bis zu drei Wochen muß man generell mit dem Vorhandensein maternalen Antikörper rechnen, die den Pathogenitätstest stören (MAYR et al., 1977; ROLLE u. MAYR, 1978).

Tabelle 1 HAI-Testergebnisse aviärer Paramyxoviren nach ALEXANDER (1980)

Antiseren hergestellt in Hühnern	Sero- typ PMV	NDV-Ulster												s	t
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
a) NDV-Ulster		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	duck/Mississippi/75	duck/199/77
d) MA/35		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	duck/D3/75	
e) MC/110		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	duck/D3/75	
f) chicken/California/Yucaipa/56		2	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	duck/D3/75	
g) finch/N.Ireland-Bangor/73		2	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	duck/D3/75	
n) robin/Hiddensee/DDR/75		2	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	duck/D3/75	
i) weaver/Senegal/PLOC/77		2	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	duck/D3/75	
m) turkey/Wisconsin		3	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	duck/D3/75	
n) parakeet/Netherlands/449/75		3	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	duck/D3/75	
r) duck/HongKong/D3/75		4	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	duck/D3/75	
t) duck/Hong Kong/199/77		6	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	duck/D3/75	

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Material

3.1.1. Virusisolat

Virologische Routineuntersuchungen der Organe gestorbener Wellensittiche aus Zuchtbetrieben, in denen immer wieder Tiere erkrankten und starben, wurden in den vergangenen Jahren im Institut für Hausgeflügel, Zier- und Zoovögel in Oberschleißheim regelmäßig durchgeführt.

Als klinische Symptome waren bei den Vögeln Apathie, Umfangsvermehrung des Abdomens, Flugunfähigkeit und Durchfall beobachtet worden. Seltener traten ZNS-Störungen auf. Pathologisch-anatomisch zeigten die Tiere Hepatitis, gelegentlich Lebertumore, Nephritis, Milzhyperplasie, eine katarrhalische Enteritis und in wenigen Fällen Federanomalien. Selten kamen auch Pneumonien vor. Histologisch wurden u.a. in einer Leber Riesenzellen gefunden. Bakteriologische, mykologische und parasitologische Untersuchungen der Tiere ergaben meist keinen besonderen Befund.

Aus Leber, Lunge, Niere und Milz dieser Vögel wurden 20 %ige Organuspensionen hergestellt und auf embryonierte Hühnereier verimpft. In der ersten CAM-Passage wiesen einige Embryonen Lebernekrosen und die CAM selbst kleine proliferative Herde auf. Ein Teil der Isolate, der aufgrund des AGP-Tests den Herpesviren zugeordnet werden konnte, wurde nicht weiter untersucht. In der zweiten AH-Passage reagierte die AAF anderer Isolate im SA-Test mit 10 %igen Hühnerythrozyten deutlich positiv. Eine Prüfung durch den AGP-Test mit bekannten Immunsereen gegen NDV, Influenza A I und Parainfluenza II, Stamm Stuttgart I, ergab häufig eine gemeinsame Reaktion mit Antikörpern gegen NDV und Parainfluenza II. Einige Isolate reagierten mit Seren gegen Parainfluenza II alleine, während Tests mit Influenza A I-Seren nie ein positives Ergebnis brachten.

Ein zu Beginn des Jahres 1979 gewonnenes Wellensittichisolat mit der Bezeichnung 657, das Gegenstand dieser Arbeit ist, wurde für die weitere

Charakterisierung bei -80°C aufbewahrt. Am Anfang meiner Untersuchungen wurde das Virus nach zwei erneuten Eikulturpassagen nochmals bakteriologisch und mykologisch getestet. Die Befunde waren wieder negativ. Der HA-Titer lag bei 1:64.

3.1.2. Virusreferenzstämme

Die im Labor verwendeten ND-Stämme Montana (HA 1:128) und Italien (HA 1:256) wurden durch den Stamm Myadera (HA 1:64) ergänzt, der vom National Health Institut in Tokio zur Verfügung gestellt worden war.¹⁾ Aus dem gleichen Institut erhielten wir folgende aviäre Paramyxoviren:¹⁾

1) chicken/California/Yucaipa/68	HA 1:64
2) turkey/Wisconsin/68	HA 1:32
3) pigeon/Japan/Otaru/76	HA 1:64
4) duck/HongKong/199/77	HA 1:32
5) duck/HongKong/D3/75	HA 1:32
6) parakeet/Netherlands/75	HA 1:64
7) budgerigar/Tokyo/Kunitachi/73	HA 1:64 (bei gereinigter AAF)

Alle Stämme waren Anfang 1980 zuletzt vermehrt worden und durchliefen vor der Verwendung in unserem Institut noch drei weitere Passagen. Die AAF wurde gepoolt und der HA-Titer bestimmt.

Das Isolat finch/N. Ireland/Bangor/73 wurde uns aus Nordirland zur Verfügung gestellt¹⁾. Der AAF-Pool der dritten Institutspassage wurde verwendet. Sein HA-Titer lag bei 1:128.

Das Parainfluenza II Virus, Stamm Stuttgart, hatte nach der dritten für diese Versuche durchgeführten Passage einen HA-Titer von 1:16.

Ein Influenza A Stamm vom Huhn und ein Eulenherpesvirus wurden nach der 16. bzw. 18. Institutspassage zu den Untersuchungen herangezogen.

1) Für die freundliche Überlassung der Virusstämme und Antiseren danke

ich Prof. Nakayama und Prof. Nerome, Tokio sowie J.B. Mc Ferran, Stormon

3.1.3. Referenzseren

Um ein Immunserum gegen das Isolat 657 zu gewinnen, wurden vier 20 Monate alte weiße Leghorn Hybridhähne (SPF) subcutan mit 2 ml formolinaktiviertem Virus infiziert (MAYR et al., 1977). Nach drei Wochen wurde unverdünntes Virus in gleicher Dosis intramuskulär verabreicht. Weitere 14 Tage später wurden die Tiere getötet und ausgeblutet. Das Serum wurde bei 56°C eine halbe Stunde lang inaktiviert und hatte im HAH gegen das homologe Virus einen Titer von 1:512.

Das National Health Institut, Tokio, stellte uns Immunseren vom Kaninchen gegen Bangor, Myadera, duck/D3, duck/199 und parakeet/449 sowie vom Huhn gegen Yucaipa, Kunitachi, pigeon/Otaru und turkey/Wisconsin zur Verfügung.¹⁾ Die Seren waren bereits inaktiviert. Ihr Titer ist aus Tabelle 9 zu entnehmen.

Immunseren gegen die beiden im Labor verwendeten ND-Stämme sowie gegen das Parainfluenza II Virus, den Influenza A I Stamm und das Eulenherpesvirus, die durch Verimpfung auf SPE-Hühner hergestellt worden waren, standen zur Verfügung.

3.1.4. Kultursysteme

3.1.4.1. Embryonierte Hühnereier

Verwendet wurden Bruteier folgender Herkunft:

- Valo-Eier der Firma Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven, die laut Prüfbericht frei von den Erregern folgender Krankheiten sind:
- Aviäre Enzephalomyelitis - Reovirus-Infektionen - Influenza des Huhnes
- Newcastlekrankheit - Infektiöse Bronchitis - Leukose/Rous Sarkom
- aviäre Adenovirusinfektionen - Infektiöse Bursitis - Hühnerpocken
- Salmonellose - Mykoplasmosen
- Eier der klinikeigenen SPF-Hühnerherde, die mit gleichem Ergebnis wie die Valo-Eier geprüft wurden.

3.1.4.2. Embryonierte Enten- und Gänseeier

Die Moschusenten- und Gänseeier stammten von klinikeigenen Herden, die sich bei regelmäßigen Tests immer als frei von bekannten Virusinfektionen erwiesen.

3.1.4.3. Hühner- und Moschusentenembryofibroblasten

Zur Gewinnung von Fibroblasten dienten zehntägige Embryonen aus Valo-Eiern bzw. 14-tägige Embryonen aus Moschusenteneiern. Sie wurden unter sterilen Bedingungen entnommen und nach Abtrennen von Kopf und Extremitäten sowie Entfernung der Organe mechanisch zerkleinert. Nach dem Waschen mit steriler PBS-Lösung erfolgte der Aufschluß der Zellen durch fraktionierte Trypsinbehandlung (0,25 %ig, DIFCO) bei Zimmertemperatur. Die so gewonnene Zellauspension wurde durch einen Gazefilter gegeben, bei 1000 U/min. 30 Minuten lang zentrifugiert und in Wachstumsmedium aufgenommen. Nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C in Roux-Flaschen waren die Zellen zu einem dichten Rasen ausgewachsen. Die Entenembryofibroblasten brauchten dazu in der Regel einen Tag länger. Die FHE wurden dann mit einer Trypsin-Versen-Mischung von der Flasche abgelöst, in Wachstumsmedium aufgenommen und nach Dichteschätzung als Sekundärzellen auf Petrischälchen oder Mikroplatten aus Polystyrol (NUNC, Dänemark) ausgesät.

Die Sekundärkulturen wurden bis zur Entstehung eines dichten Zellrasens bei 37°C, hoher Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ im offenen System im Brutschrank (HERAUS) inkubiert. Das Wachstumsmedium wurde nach durchschnittlich drei Tagen gegen ein Erhaltungsmedium ausgetauscht. Die Kultur konnte dann beimpft werden.

3.1.4.4. Hühner- und Schweinenierenzellen

Nach steriler Entnahme der ganzen Nieren von 1-tägigen Küken wurden die primären Hühnernierenzellen nach mechanischer Zerkleinerung durch die

fraktionierte Trypsinierung bei Zimmertemperatur aufgeschlossen. Die weitere Behandlung verlief wie oben beschrieben. Sekundärzellen konnten nach einer Bebrütungszeit von vier Tagen angelegt werden.

Die Schweinenierenzellkultur wurde uns von der Landesuntersuchungsanstalt in Oberschleißheim zur Verfügung gestellt. Die Zellen entstammten einer Zelllinie, die bereits die 20. Passage durchlief.

Reagentien für die Zellkultur

- steriler, Ca^{+} und Mg^{+} freier PBS-Puffer, pH 7,3
- Trypsin-Versen-Mischung aus 1 %igem Titriplex III und 0,05 %igem Trypsin

Medium für Embryofibroblasten

500 ml enthalten:

- 0,65 g LAH (TC Laktalbumin Hydrolysat BACTO)
- 0,37 g TBP (Tryptosephosphatbroth BACTO)
- 0,26 g F10 (TC Medium HAM F-10 DIFCO)
- 4 % Earle's A-Lösung
- 2 % Earle's B-Lösung
- 3 % foetales Kälberserum (SEROMED) im Erhaltungsmedium
- 5 % foetales Kälberserum (SEROMED) im Wachstumsmedium
- 0,8 % Penicillin-Streptomycin (HOECHST)
- 0,4 % Moronal (SQUIBB)

Medium für Nierenzellen

1000 ml enthalten:

- 79 % Earlesche Salzlösung
- 10 % LAH (BACTO)
- 10 % foetales Kälberserum im Wachstumsmedium
- 5 % foetales Kälberserum im Erhaltungsmedium
- 1 % Phenolrot
- 0,1 % Moronal
- 0,4 % Penicillin-Streptomycin

Alle Medien wurden steril filtriert und vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

3.2. Methoden

3.2.1. Virusvermehrung in embryonierten Hühner-, Enten- und Gänseeiern

3.2.1.1. Impfmethoden und Kontrolle des Infektionsverlaufs

Als Ausgangsmaterial für die Virusisolierung diente eine 20 %ige Organsuspension in 0,85 %iger NaCl-Lösung. Nach zehnminütigem Zentrifugieren bei 4000 U/min. wurden dem Überstand 500 000 I.E./ml Penicillin und 0,2 g/ml Streptomycin (HOECHST) zugegeben. Von dieser Mischung wurden 0,2 ml je Ei verimpft. In den Passagen wurde eine entsprechend behandelte Mischung aus AAF und homogenisierter CAM im Verhältnis 2:1 verwendet. Als Impfmethoden fanden die CAM-Inokulation bei unbesenkter CAM sowie die AH- und die DS-Beimpfung gemäß der Technik von MAYR et al. (1977) Verwendung. Dazu wurden die Eier - der Inokulationsmethode entsprechend - unterschiedlich lange vorbebrütet (zehn, neun und sechs Tage) und dann auch unterschiedlich lange bei 37°C im Brutschrank belassen (sieben, fünf und sechs Tage). Pro Passage wurden mindestens vier Eier beimpft und anschließend in 24-stündigem Abstand geschickt. Abgestorbene Eier wurden sofort steril geöffnet und AAF, Embryo und CAM zur Beurteilung entnommen. Eier, die nach Ablauf der Bebrütungszeit noch überlebende Embryonen enthielten, wurden zur Abtötung 20 Minuten lang auf -20°C gekühlt und dann ebenso behandelt. Die AAF wurde immer mit 10 %iger Hühnererythrozytensuspension im SA-Test auf Hämagglutination vorgetestet. Bakteriologische und mykologische Untersuchungen aller abgestorbenen Eier folgten.

Für Bestimmung des Infektionsverlaufes wurden von 18 Eiern pro Impfmodus täglich drei geöffnet und beurteilt sowie im SA-Test geprüft.

Ermittlung und Beobachtung des Verhaltens des Isolates in den embryonierten Enten- und Gänseeiern entsprachen weitgehend den für die Hühnereier beschrie-

benen Verfahren. Die geringere Verfügbarkeit befruchteter Eier schränkte das Prüfprogramm ein.

3.2.1.2. Bestimmung von Virustiter und MDT

Um den Virusgehalt der AAF zu bestimmen, wurde eine Verdünnungsreihe in Zehnerpotenzen mit steriler 0,85 %iger NaCl-Lösung hergestellt. Pro Verdünnungsstufe wurden jeweils vier neuntägige embryonierte Hühnereier in die AH beimpft. Alle 24 Stunden wurden die Eier geschickt. Bei abgestorbenen Embryonen erfolgte eine bakteriologische und mykologische Untersuchung. Die AAF der toten und der nach 120 Stunden abgetöteten Embryonen wurde ferner dem SA-Test unterzogen. Die ELD_{50} berechnete sich aufgrund der spezifischen Mortalität. Nur sterile, SA-positive Eier, die mehr als 24 Stunden p.i. abgestorben waren, fanden hierzu Verwendung. Die nach fünf Tagen noch lebenden Embryonen, deren AAF im SA-Test positiv reagierte, wurden bei Berechnung der ELD_{50} berücksichtigt. Die Endpunkte wurden nach der Methode von REED und MÜNCH (1938) bestimmt.

Die Ermittlung der MDT erfolgte nach dem von HANSON (1975) beschriebenen Verfahren. Durch die vorangegangene Virustitration wurde auch die höchste Verdünnung bestimmt, bei der noch alle vier Embryonen innerhalb der fünf Tage abstarben. Mit der gleichen Virusmenge wurden nochmals 36 Eier in die AH beimpft. Sie wurden in achtstündigem Abstand geschickt. Dabei betrug der Beobachtungszeitraum höchstens 128 Stunden.

3.2.1.3. Hämagglutinations- und Elutionsversuche

Die Blutspender (Tab. 2) waren gesunde Tiere des eigenen Institutes sowie der Gesellschaft für Strahlenforschung in Neuherberg¹⁾. Ca. 2-4 ml venöses Blut mit 0,5 ml einer 3,8 %igen Natriumcitrat-Lösung gemischt, wurden fünf Minuten lang bei 2000 U/min. zentrifugiert. Plasma und Leukozytensaum wurden abgesaugt, die Erythrozyten zweimal mit 0,85 %iger NaCl-

1) Für die freundliche Überlassung der Blutproben danke ich L. Ruprecht.

Lösung gewaschen und wieder zentrifugiert. Das Sediment diente zur Herstellung von 10 %igen, 1 %igen und 0,75 %igen Erythrozytensuspensionen. Alle Viren, die im SA-Test mit einer 10 %igen Erythrozytensuspension zweimal positiv reagierten, durchliefen den HA-Test zur Titerbestimmung. Der HA-Test wurde in Microtiterplatten aus Polysterol (NUNC, Dänemark) durchgeführt. Die AAF wurde dabei in $\log_2$ -Stufen verdünnt und mit der 1 %igen Erythrozytensuspension im Verhältnis 1:1 versetzt. Das Ergebnis konnte bei Zimmertemperatur nach 30 Minuten abgelesen werden.

Bei den Hühnererythrozyten wurde anschließend der Elutionstest durchgeführt. Dafür blieben die Hämagglutinationsplatten 24 Stunden bei 4°C stehen. Danach wurden die roten Blutkörperchen resuspendiert. Trat nach weiteren zwei Stunden keine erneute Hämagglutination auf, so gehörte das Isolat zu den schnell elutierenden Viren. Andernfalls war es ein langsam elutierendes Virus.

3.2.2. Virusvermehrung in der Zellkultur

3.2.2.1. Titerbestimmung und Hämaadsorptionstest

Zur Bestimmung der KID_{50} wurden dichtgewachsene sekundäre FHE- und Kükennierenzellen mit in Zehnerpotenzen verdünnter virushaltiger AAF beschickt. Pro Ansatz wurden jeweils vier Petrischalen verwendet. Parallel lief eine unbeimpfte Zellkontrolle. In der Regel wurden 0,2 ml der Virus-suspension direkt ins Medium gegeben. Für schwach virulente Stämme brachte die Adsorptionsmethode bessere Ergebnisse, bei der die virushaltige Flüssigkeit 30 Minuten lang unmittelbar auf die Zellen einwirkte, bevor das Medium dazukam. Die infizierten Kulturen und die Kontrollen wurden im offenen System bei 37°C, hoher Luftfeuchtigkeit und 5 % CO_2 (HERAEUS) bebrütet. Um den CPE festzustellen, wurden die Zellen acht Tage lang täglich im umgekehrten Mikroskop (LEITZ, Wetzlar) gemustert. Das Medium wurde im Abstand von drei Tagen gewechselt.

Trat bis zum siebten Tag p.i. kein CPE auf, so erfolgte der Nachweis des Viruswachstums mittels des Hämaadsorptionstests. Dieses Verfahren wurde

Tabelle 2: Blutspender

Spezies		Alter in Jahren	Geschlecht	Blutentnahme aus
Rind	<i>Bos primigenus domesticus</i>	5	w	V. jugularis
Ziege	<i>Capra aegagrus domestica</i>	3	m	V. jugularis
Schaf	<i>Ovis ammon domesticus</i>	6	m	V. jugularis
Pferd	<i>Equus caballus</i>	8	m	V. jugularis
Schwein	<i>Sus scrofa domestica</i>	2	m	V. auricularis
Hund	<i>Canis familiaris</i>	4	w	V. saphena
Kaninchen	<i>Oryctolagus cuniculus domesticus</i>	1	m	V. auricularis
Meerschwein	<i>Cavia aperea porcellus</i>	1/2	w	Herz
Ratte	<i>Rattus rattus</i> (Albino)	1/2	w	Herz
Maus	<i>Mus musculus</i> (Albino)	1/4	m	Herz
Meerkatze	<i>Allenopithecus nigroviridis</i>	4	m	V. saphena
Huhn	<i>Gallus domesticus</i>	2	w	V. cutanea ulnaris
Taube	<i>Columbia livia</i>	1	m	V. cutanea ulnaris
Gans	<i>Anser anser</i>	2	w	V. cutanea ulnaris
Ente	<i>Cairina moschata</i>	1/2	w	V. cutanea ulnaris
Mensch		29	w	V. ulnaris
Blutgruppe 0				

bevorzugt, weil die Hämagglutination im Zellkulturmedium häufig nur schwach ausfiel. Auf die zweimal mit PBS-Lösung gewaschenen Kultur wurden 2 ml einer 0,75 %igen Hühnerythrozytensuspension für 30 Minuten bei Zimmertemperatur einwirken lassen. Nach Abspülen mit PBS-Lösung waren bei positivem Ergebnis im Mikroskop herdförmig an den virushaltigen Zellen festhaftende Anlagerungen von Erythrozyten zu sehen.

3.2.2.2. Plaquetest

FHE-Kulturen wurden nach der Adsorptionsmethode mit den oben beschriebenen Virusverdünnungen infiziert und mit Agar-Overlay-Medium (1,5 %iger Agar und Erhaltungsmedium im Verhältnis 1:1) überschichtet. Drei Tage p.i. erfolgte die Färbung mit 2 ml Neutralrotlösung ($1:10^4$ verdünnt, MERCK, Darmstadt). Nach fünfstündiger Inkubation bei 37°C wurden die Plaques im umgekehrten Mikroskop ausgezählt und morphologisch beurteilt.

3.2.2.3. Färbung der Kulturen auf CPE und Einschlußkörperchen

Zur besseren Sichtbarmachung des CPE wurden die infizierten Zellkulturen zwischen dem zweiten und sechsten Tag p.i. mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Nach zweimaligem Waschen mit steriler PBS-Lösung wurde mit Bouin'scher Lösung fixiert. Deren gelbe Farbe verschwand nach 20-minütigem Aufenthalt im Alkoholbad. Die anschließende Kernfärbung nach Delafield dauerte acht Minuten. Dann wurde 30 Minuten gewässert und 15 Minuten mit Eosin (35 %ig) nachgefärbt, kurz in Aqua dest. gespült und mit der auf- und absteigenden Alkoholreihe entwässert. (MAYR et al., 1977).

Eine weitere Färbemethode, die zur speziellen Darstellung von Einschlüssen dient, kam ebenfalls zur Anwendung. Die Zellkultur wurde wie oben beschrieben gewaschen und mit Aceton für 30 Minuten fixiert. Danach folgte eine zweistündige Überschichtung mit 10 %iger Giemsa-Lösung und die Entwässerung mit Alkohol. Die nach beiden Methoden gefärbten Kulturen wurden im Ortholux Mikroskop (LEITZ, Wetzlar) beurteilt.

3.2.3. Physikalisch-chemische Untersuchungen

3.2.3.1. Tenazitätsprüfung

10 %iges Chloroform pro analysi wurde mit der zu testenden Virussuspension im Verhältnis 10:1 versetzt, bei 4°C 30 Minuten lang geschüttelt und für 24 Stunden aufbewahrt. Nach 20-minütigem Zentrifugieren bei 4000 U/min. wurden der Überstand und eine unbehandelte Viruskontrolle in Zehnerpotenzen verdünnt (10^{-1} - 10^{-8}). Zur Prüfung der Infektiosität dienten sekundäre FHE-Kulturen.

Eine Mischung aus 10 %igem Äther pro analysi mit virushaltigem Material wurde wie der Chloroform-Ansatz behandelt. Zur Reinigung der Mischung wurde der Äther verdampft. Danach wurde wie beschrieben titriert und auf Infektiosität geprüft.

Für den Hitzetest erfolgte eine Inkubation des Virusmaterials im Wasserbad bei konstant 56°C. Proben wurden nach 0, 15, 30, 45 und 60 Minuten entnommen, abgekühlt und nach Titration zur Beurteilung auf FHE verimpft. Die gleichen Proben wurden auch zur Bestimmung der Hitzebeständigkeit des Hämagglutinins mit Hilfe des HA-Titers herangezogen.

Das Verhalten des Isolates bei verschiedenen pH-Werten wurde im Säuretest mit dem McIlvaine-Puffer untersucht (MAYR et al., 1977). Nach Mischung der Zitrat- und der Karbonatlösung erfolgte eine genaue Einstellung mit dem pH-Meter. Für pH 3, pH 6 und pH 9 wurde je ein Ansatz vorgesehen. Dazu wurde der Puffer mit dem Virusmaterial im Verhältnis 10:1 gemischt und bei 37°C 60 Minuten lang inkubiert. Zur Prüfung der verbleibenden Infektiosität wurde wie oben beschrieben verfahren.

Bei allen Verfahren lief immer eine unbeimpfte Zellkontrolle mit.

3.2.3.2. Bestimmung der Nukleinsäure

Zur Bestimmung des Nukleinsäuretyps wurde virushaltige AAF wie beschrieben verdünnt (10^{-1} - 10^{-8}). Pro Verdünnungsstufe wurden jeweils vier sekundäre

FHE-Kulturen infiziert. Zwei der Petrischälchen wurden dann nach einstündiger Adsorptionszeit nur mit dem üblichen Erhaltungsmedium beschickt, während die beiden übrigen Schälchen ein mit $100 \mu\text{g/ml}$ JUDR (SIGMA) versetztes Medium erhielten. Als Kontrolle dienten ebenso behandelte FHE-Kulturen, in die entweder ein bekanntes RNS- oder ein bekanntes DNS-Virus inokuliert wurde, sowie unbeimpfte Zellen. Alle Kulturen wurden bei 37°C und $5\% \text{CO}_2$ bis zur Zerstörung des Zellrasens durch einen spezifischen CPE bebrütet. Die maximale Bebrütungsdauer betrug acht Tage.

3.2.3.3. Untersuchung der Neuraminidaseaktivität

Die für die Paramyxoviren typische Neuraminidase setzt aus Fetuin einen roten Farbstoff frei, dessen Intensität im Photometer nachgewiesen werden kann.

In der vorliegenden Arbeit fand die Methode von AYMARD-HENRY et al. (1974) Verwendung. Das zu untersuchende Virus wurde in Zweierpotenzen verdünnt und mit $0,15\text{M}$ NaCl-Lösung und Fetuin (SIGMA) im Verhältnis $1:1:2$ gemischt. Ein Phosphatpuffer diente zur Einstellung eines pH-Wertes von $5,9$. Nach Zugabe von Perjodatreagenz (SIGMA), Arsenitreagenz (SIGMA) und Thiobarbitursäure (SIGMA) wurde die Mischung 15 Minuten lang auf 40°C erwärmt. Kennzeichen eines positiven Ergebnisses war das Auftreten einer roten Farbe, die nach dem Abkühlen durch Zugabe von Butanol (SIGMA) fixiert wurde. Die durch diese Behandlung gewonnenen Lösungen wurden 25 Minuten lang bei 1000 U/min. zentrifugiert. Die Adsorption wurde bei einer Wellenlänge von 549 nm im Spektrophotometer (PHILIPS) gemessen. Als Nullwert diente eine Fetuinleerprobe. Nur Verdünnungen, die eine Adsorption im Bereich von $0,45$ bis $0,85$ hatten, wurden graphisch dargestellt. Der größte gemessene Wert bezeichnete die 100% ige Neuraminidaseaktivität. Zum Vergleich wurden die Werte eines in gleicher Weise behandelten neuraminidasepositiven ND-Stammes und eines -negativen Herpesisolates herangezogen.

Ferner wurde durch Veränderung der Versuchsanordnung das Verhalten der

Neuraminidase bei unterschiedlichen pH-Werten und steigenden Umgebungstemperaturen gemessen. Der beschriebene Fetuin-Ansatz wurde durch Veränderung des Puffers auf die pH-Werte 4, 4,5, 5, 5,5 und 6 eingestellt. Das zu untersuchende Virus wurde jetzt unverdünnt dazugegeben. Das Verfahren verlief im übrigen wie beschrieben. Die im Photometer gemessenen Werte wurden als Prozent der Aktivität je pH-Stufe in einer Graphik aufgetragen. So wurde ermittelt, bei welchem pH-Wert eine maximale Aktivität gegeben war. Im Hitzestabilitätstest wurde unverdünnte Virussuspension fünf Minuten lang bei verschiedenen Temperaturen (45°C , 50°C , 55°C , 60°C , 65°C) inkubiert und nach der zu Beginn dieses Kapitels beschriebenen Methode weiterbehandelt. Eine Graphik verdeutlicht die Temperatur, bei der noch 50 % der Neuraminidaseaktivität erhalten war.

3.2.3.4. Hämolysetest

Die Intensität der durch die Paramyxoviren bewirkten Hämolysen von Hühnererythrozyten wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 540 nm untersucht. Wieder wurde eine Verdünnungsreihe mit virushaltiger AAF (Abstufung in Zweierpotenzen) angelegt. Je 0,2 ml wurden mit 0,8 ml einer 10 %igen Erythrozytensuspension gemischt und 30 Minuten lang bei 4°C aufbewahrt. Dann folgte die Zugabe von 0,8 ml einer 1 %igen EDTA-Lösung. Nach 60-minütigem Schütteln bei 37°C und 10-minütigem Zentrifugieren bei 2000 U/min. wurde die Adsorption des Überstandes im Photometer ermittelt. In einer Graphik können die aus dem Vergleich mit einem hämolyseseitigen ND-Stamm und einem -negativen Influenzavirus gewonnenen Ergebnisse verdeutlicht werden. Auch hier wurde die größte gemessene Adsorption als 100 %ige Hämolysaktivität dargestellt.

Als Nullwert diente eine gleich behandelte Mischung ohne das Virus.

3.2.3.5. Größenschätzung nach Filtration

Virushaltige AAF wurde mit 0,85 %iger NaCl-Lösung im Verhältnis 1:10

verdünnt und durch Millipore-Membranfilter (BREDFORD, U.S.A.) mit den Porengrößen 0,1, 0,22 und 0,45 μ gegeben. Die Filtrate wurden auf 10^{-1} - 10^{-8} verdünnt. Pro Verdünnungsstufe wurden vier Petrischälchen sekundärer FHE beimpft. Nach Beurteilung des CPE bis zum achten Tag p.i. wurde die jeweilige KID₅₀ nach der Methode von REED und MÜNCH (1938) berechnet.

3.2.3.6. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Aus der sechsten Passage des Isolates 657 in Valo-Eiern wurden am dritten Tag p.i. 20 ml AAF entnommen und zweimal bei 4000 U/min. zentrifugiert. Aus dem Überstand wurde das Virus 657 in einem Festwinkelrotor (BECKMAN) bei ca. 30 000 U/min und 5°C für 30 Minuten konzentriert. Die so gewonnenen Pellets wurden in 2 ml einer 0,15M NaCl-Lösung resuspendiert. Von dieser Suspension wurde ein Mikrotropfen auf ein befilmtes und kohlebedampftes Trägernetz gebracht und nach dem Trocknen mit 2%iger Phosphorwolframsäure kontrastiert. Das Durchmustern des Präparates erfolgte bei einer primärer Vergrößerung von 1:20 000 im Elektronenmikroskop (SIEMENS ELMI I). Die elektronenoptischen Aufnahmen wurden dann photographisch dreifach vergrößert.¹⁾

3.2.4. Serologische Untersuchungen

3.2.4.1. Hämagglutinationshemmungstest

Die Bestimmung der HAH-Antikörper in verschiedenen Immunseren wurde nach der β -Methode in Mikrotiterplatten auf Polystyrol (NUNC, Dänemark) durchgeführt und als Kreuzhemmungstest angelegt. Dabei wurde eine Virusverdünnung, die noch vier HA-Einheiten hatte, im Verhältnis 1:1 mit titriertem Serum (Abstufung der Verdünnung in Zweierpotenzen) versetzt und 15 Minuten inkubiert. Nach Hinzufügen einer 0,75 %igen Hühnererythrozytensuspension konnte der Titer nach 30 Minuten bei Zimmertemperatur abgelesen werden. Das Ergebnis wird allgemein als reziproker Wert der Verdünnung ausgedrückt, die noch eine vollständige Hemmung der Hämagglutination

1) Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät München vorgenommen.

bewirkt. Zur Kontrolle dienten reine Serum-, Virus- und Erythrozytenansätze (MAYR et al., 1977).

3.2.4.2. Agargelpräzipitationstest

Der Präzipitations- oder Immunodiffusionstest nach Ouchterlony wurde mit der Mikromethode in halbfestem Agamedium durchgeführt (1,7 g Bacto-Agar, DIFCO, in 100 ml 8 %iger NaCl-Lösung mit pH 7,3 und 4 % Polyäthylenglycol). Dabei betrug die Schichtdicke zwei, der Depotdurchmesser drei Millimeter. Die Depotanordnung war sternförmig. Als Testantigen diente homogenisiertes CAM-Material infizierter Eikulturen, während die zur Verfügung stehenden Hyperimmunseren gegen Paramyxoviren sowie gegen Influenza-, Reo- und Adenoviren des Huhnes als Testseren Verwendung fanden. Die Agarplatten wurden 24 Stunden in der feuchten Kammer bei 37°C inkubiert und bis zur Auswertung ein bis zwei Tage lang bei Zimmertemperatur belassen. Das Ablesen der Präzipitationslinie erfolgte im indirekten Licht. Eine Färbung mit einer 1 %igen Lösung von Amidoschwarz in 98 %igem Methylalkohol, Aqua dest. und Eisessig diente zur Verdeutlichung (MAYR et al., 1977). Der Agar wurde mit 2 %iger Essigsäure entfärbt. Bei positiver Reaktion blieb eine blaue Linie zwischen Antigen und Serum zurück.

3.2.4.3. Neutralisationstest

Die $\angle$ -Methode der Virusverdünnung bei konstanter Serummenge wurde angewendet. Die Virussuspension wurde titriert (Abstufung der Verdünnungsreihe in Zehnerpotenzen) und mit im Verhältnis 1:10 vorverdünnten Antiseren zu gleichen Teilen gemischt. Nach einstündiger Inkubationszeit bei Zimmertemperatur wurden sekundäre FHE-Kulturen in Mikrotiterplatten mit dem oben beschriebenen Material beimpft. Zum Vergleich dienten eine Virustitrierung ohne Serumzusatz, eine Serumkontrolle und die übliche unbeimpfte Zellkultur. Alle Kulturen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ bebrütet und bis zum siebten Tag p.i. täglich auf Veränderungen untersucht. Am Ende des

Versuches wurde jeweils die KID_{50} berechnet. Als signifikant für eine Neutralisation galt ein Titerunterschied von mindestens 10^2 . Bei positivem A fall einer Probe wurde der Kreuztest durchgeführt. Die Differenzen zwischen homologen und heterologen Systemen wurden auch in Prozentzahlen ausgedr

3.2.4.4. Plaquereduktionstest

Dieser Test beruht ebenfalls auf der Virushemmung durch neutralisierende Antikörper. Hier fand die β -Methode mit einer Serumverdünnungsreihe (Abstufung in Zweierpotenzen) Verwendung. Den Referenzseren wurde nach der Titration eine konstante Virusmenge von 100 plaqueproduzierenden Einheiten beigemischt und eine Stunde lang inkubiert. Pro Verdünnungsstufe wurden damit vier sekundäre FHE-Kulturen beschickt. Nach Adsorption des Gemisch für 30 Minuten wurde mit AGAR-Overlay-Medium überschichtet und nach Färbung mit Neutralrot ausgewertet. Das Verfahren wurde bereits in einem früheren Kapitel beschrieben. Als Neutralisationsindex diente der reziproke Faktor der Serumverdünnung, die noch ein Auftreten von Plaques in der Zellekultur verhinderte. Kontrollen waren ein Virus- und ein Serumansatz sowie unbeimpfte Zellen.

3.2.5. Tierversuche

3.2.5.1. Bestimmung des ICPI beim Eintagsküken

Acht Eintagsküken aus SPF-Zucht, zwischen 24 und 40 Stunden alt, wurden mit 0,05 ml unverdünnter Virussuspension intrazerebral beimpft und dann in Isolationskäfigen gehalten. Während der folgenden acht Tage wurden die Tiere täglich untersucht. Erkrankungen und Todesfälle wurden registriert und nach HANSON (1975) mit Punkten bewertet (null Punkte für gesund, ein Punkt für krank und zwei Punkte für tot). Die Summe der vergebenen Punkte wurde zur Berechnung des ICPI durch die Zahl der Beobachtungen geteilt.

Zur Kontrolle wurden zwei Eintagsküken mit 0,05 ml. steriler NaCl-Lösung intrazerebral beimpft, dann separat gehalten und ebenfalls acht Tage lang beobachtet.

Eine Rückisolierung des Isolates aus Gehirn und Organsuspensionen gestorbener bzw. nach acht Tagen getöteter Küken wurde über die Eikultur versucht. Das Serum der Überlebenden des Tests wurde zuvor einer Prüfung auf HAH-Antikörper unterzogen.

3.2.5.2. Prüfung der Pathogenität für achtwöchige Hühner

Zwei Gruppen SPF-Küken, die bei serologischer Überprüfung negativ reagierten, mit je vier Tieren erhielten das Virusisolat unverdünnt intranasal bzw. intramuskulär. Jede Gruppe wurde dann durch ein Kontakttier ergänzt. Alle Hühner wurden in Isolationskäfigen bei konstanter Temperatur und gefilterter Luft gehalten und ad libitum gefüttert. Die Tötung von Tieren ohne klinischen Befund erfolgte 21 Tage p.i., zuvor wurde ihnen Blut für serologische Untersuchungen abgenommen. Gestorbene und getötete Hühner wurden immer sofort auf pathologisch-anatomische Veränderungen untersucht. Aus dem Organmaterial aller Tiere wurde eine Rückisolierung des Virus über die Eikultur versucht. In den gewonnenen Seren fand eine Antikörperbestimmung statt.

3.2.5.3. Prüfung der Pathogenität für adulte Wellensittiche

Zehn Wellensittiche aus kommerzieller Zucht, die klinisch gesund und bakteriologisch, parasitologisch und virologisch unverdächtig waren, wurden in zwei Gruppen aufgeteilt. Je vier Tiere erhielten das unverdünnte Virusisolat intranasal bzw. intramuskulär. Ein Wellensittich pro Gruppe diente als Kontakttier. Alle Vögel wurden wie die Hühner isoliert, mit einem handelsüblichen Futter ad libitum sowie gelegentlich mit Kolbenhirse gefüttert. Die Tötung der überlebenden Tiere des Versuches erfolgte nach der Blutabnahme am 25. Tag p.i.. Alle Tierkörper wurden hinsichtlich

pathologisch-anatomischer sowie histologischer Veränderungen untersucht. Organmaterial diente zur Rückisolierung des Virus, die Seren überlebender Vögel zur Antikörperbestimmung.

4. ERGEBNISSE

4.1. Wachstumsverhalten des Isolates

4.1.1. Verhalten in der Eikultur

Im Gegensatz zu den Virusisolaten von Wellensittichen, die sich in der Folge als ND-Stämme erwiesen, führte das Isolat 657 bei AH- und DS-Inokulation erst am vierten Tag p.i., bei CAM-Inokulation erst am fünften Tag p.i. zum Absterben der bebrüteten Hühnereier. Bei Beimpfung der CAM mit unverdünntem Virus überlebten regelmäßig einige Embryonen die Infektion. Die pathologisch-anatomischen Veränderungen der Embryonen waren bei allen Impfmethoden gleich und bestanden aus einer Stauungsblutfülle aller Organe, petechialen Blutungen in der Haut und flächenhaften Blutungen unter die Schädelkalotte. Die Embryonen waren häufig verzweigt und mazeriert. Die CAM war nur bei direkter Beimpfung verändert. Gelegentlich wurden dann winzige weiße Verdichtungsherde und Blutungen gefunden.

Eine Züchtung des Isolates in Gänse- und Enteneiern gelang erst nach Adaptierung über zwei AH-Passagen. Danach wiesen die Gänse- und Entenembryonen die gleichen, bereits beschriebenen, Veränderungen auf. Die Mortalität war geringer und der Embryotod um 24 Stunden verzögert.

Kennzeichnend für den Infektionsverlauf in den Hühnereiern war, daß nach AH- und DS-Inokulation mit dem Isolat 657 bereits 24 Stunden p.i. eine deutliche Hämagglutination der AAF und leichte Hautrötungen beim Embryo feststellbar waren, die am zweiten und dritten Tag zunahmen. Nach 48 Stunden traten vereinzelt Todesfälle auf. Der HA-Titer war am dritten und vierten Tag p.i. am höchsten. Eine Inokulation auf die CAM verzögerte das Auftreten von Embryoveränderungen um 48 Stunden. Eine Hämagglutination der AAF konnte zwar schon am zweiten Tag p.i. nachgewiesen werden, ihr Titer blieb aber immer zwei Stufen unter dem durch die anderen Impfmodi erreichbaren. Der Virustiter des untersuchten Isolates lag bei einer ELD_{50} von $8,5 \log_{10}/\text{ml}$ und einer ELD_{50} von $6,8 \log_{10}/\text{ml}$. Daraus folgt, daß nicht alle Embryonen, in denen es zur Virusmehrung gekommen war, im Beobachtungszeitraum abstarben (Tab. 3).

Tabelle 3: Ergebnisse zur Bestimmung des Virustiters nach REED u. MÜNCH

Verdünnungsstufen	Isolat 657			
	Tote	HA	Lebende	HA
10^{-1} - 10^{-6}	24	+	0	-
10^{-7}	1	+	3	+
10^{-8}	0	-	4	+
10^{-9}	0	-	4	-

Um den genauen Todeseintritt zu ermitteln, wurde die MDT bei einer Verdünnung der AAF von 10^{-6} berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefaßt. Danach betrug die MDT für das Isolat 657 ca. 80 Stunden. Im Gegensatz dazu hatten alle ND-Varianten eine MDT von weniger als 50 Stunden.

Tabelle 4: Ergebnisse der Bestimmung der MDT für Virusisolat 657

Std.	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96
Anzahl der Toten	-	-	-	1	2	4	7	7	10	5 = 36

4.1.2. Verhalten in der Zellkultur

Eine Infektion mit dem Isolat 657 bewirkte nach 48 Stunden die ersten Veränderungen in der FHE-Kultur in Form von Granulation und Abkugelung einzelner Zellen. Am dritten Tag p.i. wurde der CPE deutlicher. Zellen mit mehreren Kernen und eine langsam fortschreitende Zelllysis waren zu beobachten. Bis zum sechsten Tag p.i. hatten sich einzelne Zellverbände vom Schäl-

chenboden gelöst. Eine völlige Zerstörung der Kultur konnte im Beobachtungszeitraum nicht festgestellt werden. Eine Hämapsorption war erstmals 24 Stunden p.i. zu sehen. Der HA-Titer im Medium erreichte nie einen höheren Wert als 1:8. Die KID_{50} war mit $6,5 \log_{10}/\text{ml}$ mit der EID_{50} vergleichbar. Ein Viruswachstum in den höheren Verdünnungen konnte nur noch mittels Hämapsorption nachgewiesen werden.

In den Entenembryofibroblasten wuchs das Isolat 657 nicht. In diesen Zellen war auch der Nachweis einer Hämapsorption nicht möglich.

Der Plaquetest in der FHE-Kultur verlief ohne Zusätze positiv. Es traten nur sehr kleine (1 mm) farblose Plaques auf. Der Virustiter lag mit $3,5 \log_{10}/\text{ml}$ plaqueproduzierenden Einheiten (PPE) sehr niedrig. Ein höheres Ergebnis von $6,0 \log_{10}/\text{ml}$ PPE wurde erzielt, wenn man die Zellen erst fünf Tage färbte. Das morphologische Bild der klaren Plaques war von Zelllysis und nur wenigen Synzytien gekennzeichnet.

In Hühner- und Schweinenierenzellen wuchs das Isolat mit deutlichem CPE. Bis zu zehnkernige Zellen, Kern- und Zytoplasmavakuolen sowie eine fortschreitende Zelllysis, die schneller verlief als in den FHE-Kulturen, waren die Hautmerkmale. Auf eine Untersuchung des Verhaltens von Virusverdünnungen in Schweinenierenzellen wurde verzichtet. Für die Hühnernierenzellen betrug die KID_{50} $6,8 \log_{10}/\text{ml}$. Sie konnte durch Hämapsorption nicht mehr erhöht werden. Gegenüber der FHE-Kultur fielen die bei fast gleichem Virustiter wesentlich ausgeprägteren Zellveränderungen auf.

Sowohl bei Hämatoxylin-Eosin als auch bei der Giemsa-Färbung waren in allen Zellkulturen, in denen makroskopisch ein CPE zu sehen war, zahlreiche Synzytien mit großen vakuolisierten Kernen und vermehrter Granulation im Zytoplasma nachweisbar. Zytoplasmatische Einschlüsse konnten hingegen in keiner Zellart eindeutig festgestellt werden.

4.1.3. Hämagglutination, Hämapsorption und Elution

Die Fähigkeit der Paramyxoviren Erythrozyten zu agglutinieren dient zum Nachweis dieser Erreger beim Fehlen spezifischer Veränderungen im Kultursystem.

Die Ergebnisse der Hämagglutinationsversuche mit virushaltiger AAF sind Tabelle 5 zu entnehmen. Alle Referenzstämme wurden mitgeprüft, da ihr Hämagglutinationsmuster meist nicht vollständig bekannt ist. Isolat 657 und parakeet/Netherlands/449/75 agglutinierten - allerdings mit sehr unterschiedlicher Intensität - Erythrozyten von Mensch, Hund, Rind, Pferd, Schaf, Meerschwein, Huhn, Gans, Ente und Taube. Eine Hämagglutination mit Erythrozyten von Ziege, Schwein, Affe, Kaninchen, Ratten und Maus konnte nicht festgestellt werden. Auch andere Virusstämme wie Yucaipa und Bangor erwiesen sich als identisch hinsichtlich ihrer Hämagglutinationsmuster. Drei ND-Stämme zeigten ebenfalls entsprechende Übereinstimmungen untereinander.

Die HämadSORption mit Hühnererythrozyten in den Zellsystemen, in denen das Isolat mit einem ausgeprägten CPE wuchs, brachte immer deutlich positive Ergebnisse. Ihr Fehlen wurde als Beweis dafür angesehen, daß keine Vermehrung stattgefunden hatte.

Elutionsvorgänge wurden nur bei den Hühnererythrozyten getestet. Langsam elutierende Viren, die nach 24 Stunden noch Hämagglutination bewirkten, waren Isolat 657, Parainfluenza II und parakeet/Netherlands/449/75. Alle ND-Stämme waren schnell elutierende Viren.

Tabelle 5

HA-Titerkennzahlen einiger Paramyxoviren mit 1 %iger
Erythrozytensuspension

Blutspender	getestete Virusstämme								
	657	a)	b)	c)	d)	e)	f)	g)	h)
Meerkatze	-	6	-	-	-	-	4	-	-
Hund	6	5	7	7	-	-	-	8	5
Ziege	-	-	-	-	-	-	-	-	3
Schaf	2	-	-	-	-	-	-	2	-
Rind	5	-	4	-	-	-	-	3	-
Pferd	3	-	5	5	6	-	-	3	-
Schwein	-----								
Ratte	-	-	5	-	-	-	-	-	4
Maus	-----								
Kaninchen	-	-	4	-	-	-	-	-	-
Meerschwein	5	4	5	3	-	3	5	6	5
Huhn	6	5/6	6	7/8	5	6	5	6	4
Gans	3	5	4	3	4	-	2	2	4
Ente	4	5	4	2	-	-	3	2	3
Taube	5	-	5	4	3	-	4	3	4
Mensch 0	5	7	6	5	-	6	-	6	5

a) Yucaipa/Bangor

b) pigeon/Japan/Otaru/76

c) NDV-Stämme

d) duck/Hong Kong/D3/75

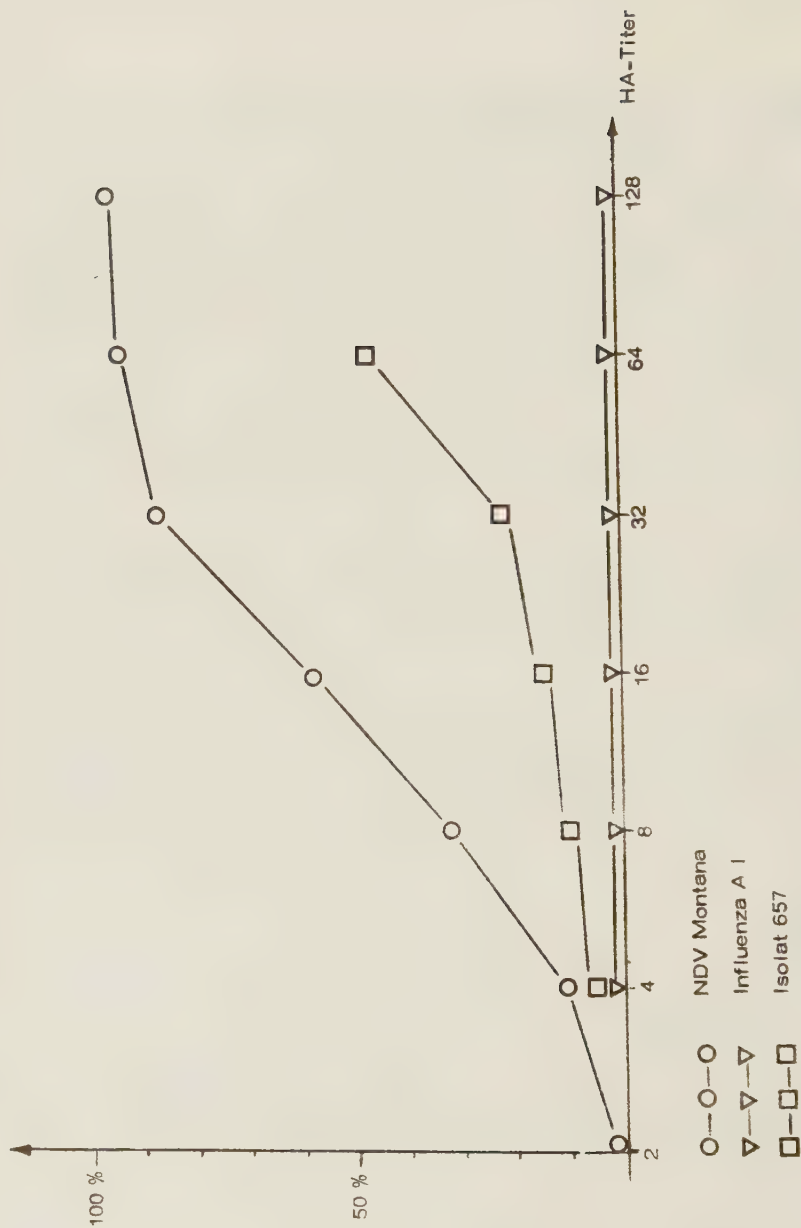
e) Kunitachi

f) turkey/Wisconsin/68

g) parakeet/Netherlands/449/75

h) Parainfluenza II Huhn

Abb. 1 Hämolyseseaktivität von Isolat 657





4.2. Physikalisch-chemische Eigenschaften

4.2.1. Tenazität

Für das Isolat 657 betrug die Differenz zwischen dem Kontrolltiter und dem Virustiter nach Chloroformbehandlung $5,0 \log_{10}/\text{ml}$. Damit erwies sich das Virus als chloroformlabil.

Beim Ätherresistenztest verminderte sich der Virustiter des behandelten Isolates gegenüber der Kontrolle um $5,1 \log_{10}$. Das Isolat 657 war demzufolge zwar ätherempfindlich, aber nicht gänzlich ätherlabil.

Im Hitzetest bewirkte die Inkubation bei 56°C , daß nach 45 Minuten kein Wachstum auf der Zellkultur mehr festgestellt werden konnte. Eine Hämagglutination von Hühnererythrozyten war nach der gleichen Inkubationszeit nicht mehr nachweisbar (Tab. 6). Isolat 657 und sein Hämagglutinin waren demnach hitzelabil.

Tabelle 6 Ergebnisse des Hitzetests bei 56°C für Virusisolat 657

Min bei 56°C	0	15	30	45	60	Min. bei 56°C	0	15	30	45	60
Titer als $\log_{10} \text{KID}_{50}$	6,8	4,0	1,5	0	0	reziproker HA-Titer	64	16	2	0	0

Im Säuretest blieb die Infektiosität für die Zellkultur bei pH 6,1 und pH 9 voll erhalten. Bei einem pH von 2,9 reduzierte sich der Virustiter auf eine KID_{50} von $2 \log_{10}/\text{ml}$. Daraus folgte, daß das Isolat 657 auch säureempfindlich ist.

4.2.2. Eigenschaften von Nukleinsäure und Hüllantigenen

Bei der Bestimmung des Nukleinsäuretyps zeigte das Virus 657 mit und ohne Zusatz von JUDR im Zellkulturmedium das gleiche Verhalten. Damit entsprach es dem als Kontrolle mitgeführten NDV. Das Isolat enthielt RNS im Nukleokapsid.

Mit Hilfe der Spektrophotometrie wurde eine deutliche Neuraminidase- und Hämolyseaktivität für das untersuchte Isolat 657 nachgewiesen, die aber schwächer war als die des ND-Stammes Montana. Abbildung 1 und 2 stellen die Ergebnisse graphisch dar. Dabei entspricht 100 %ige Aktivität der höchsten gemessenen Adsorption im jeweiligen Versuch. Die beiden Kontrollstämme, das Influenza- und das Eulenherpesvirus, zeigten erwartungsgemäß keine entsprechende Aktivität.

Die spezifischen Eigenschaften der gefundenen Neuraminidase wurden wie beschrieben untersucht und in den Abbildungen 3 und 4 dargestellt. Die ermittelten Werte sind im Vergleich mit einem Vertreter der Gruppe PMV-3 und einem ND-Stamm in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7 Verhalten der Neuraminidasen von drei Paramyxoviren

Virusstämme	pH-Optimum	50 %ige Hitzeaktivierung nach 5 Min.
NDV Montana	5,0	55°C
parakeet/Netherlands	5,2	57°C
657	4,8	60°C

Eine fünfminütige Einwirkung von 60°C auf das Isolat inaktivierte die Hälfte seiner Neuraminidase. Die höchste Neuraminidaseaktivität wurde also bei einem pH von 4,8 erzielt. Hinsichtlich der Eigenschaften der Neuraminidase unterschied sich das Virus 657 sowohl vom serologisch verwandten Parakeet-Virus als auch vom ND-Stamm Montana.

Abb. 3 Bestimmung der Hitzestabilität der Neuraminidase von Isolat 657

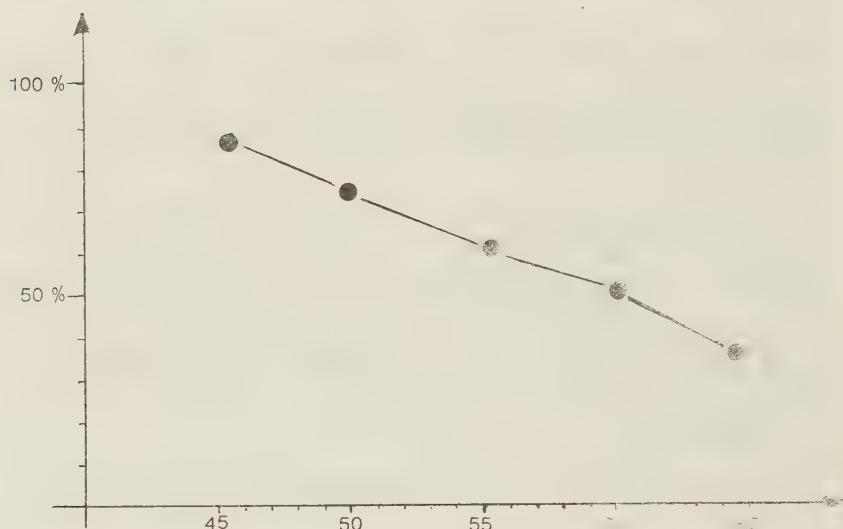
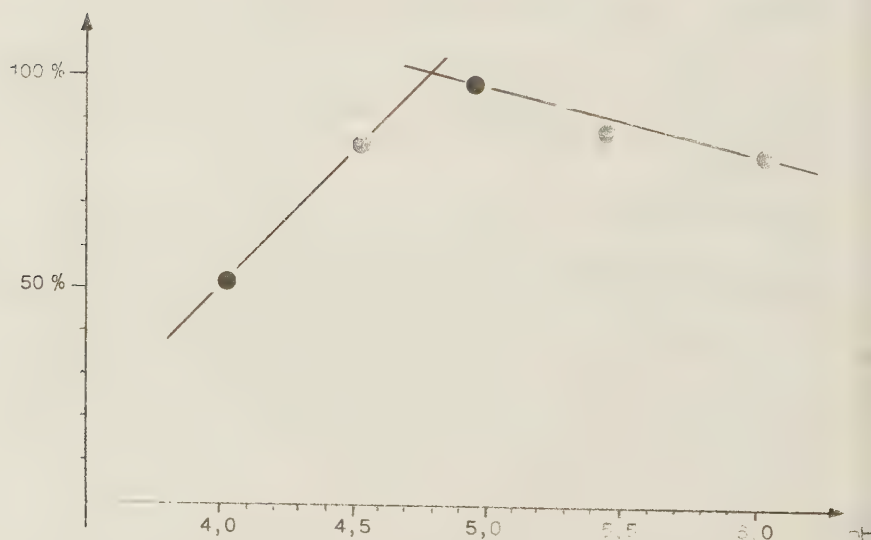


Abb. 4 Bestimmung des pH-Optimums der Neuraminidase von Isolat 657



4.2.3. Größe und Morphologie der Viruspartikel

Die Größe der Viruspartikel wurde zunächst nach Filtrationsversuchen geschätzt, deren Ergebnisse die Tabelle 8 wiedergibt.

Tabelle 8 Titerabfall nach Filtration für Virusisolat 657

Porenweite	0,45 μ	0,22 μ	0,1 μ	Ausgangstiter
KID ₅₀ als log ₁₀ /ml	6,8	2,5	1,0	6,8

Die Filtration bei einer Porenweite von 0,45 μ führte zu keinem Titerabfall, während bei einer Porengröße von 0,22 μ mehr als 99 % der Viruspartikel zurückgehalten wurden. Bei einer Porenweite von 0,1 μ passierte nur noch ein minimaler Anteil infektiösen Materials den Filter. Die Größe der Viruspartikel liegt demnach bei 220 bis 450 nm.

Die im Elektronenmikroskop gefundenen und photographierten Viruspartikel wurden genauer vermessen. Überwiegend wurden rundliche Formen angetroffen. Daneben kamen ovale und unregelmäßig begrenzte Exemplare vor. Meist waren Hülle und Spikes deutlich sichtbar. In gut gereinigten Präparaten waren auch freie Nukleokapsidstränge, sog. Heringsgräten, zu sehen.

In Abbildung 5, 6 und 7 sind einige Viruspartikel von Isolat 657 dargestellt. Die Bestimmung des Durchmessers von 20 rundlichen Teilchen ergab einen Mittelwert von 243 nm bei einer Standardabweichung von $s=21,5$ nm. Drei ovale Formen mit aufgelockerter Innenstruktur und Ausbuchtungen maßen fast 400 nm.

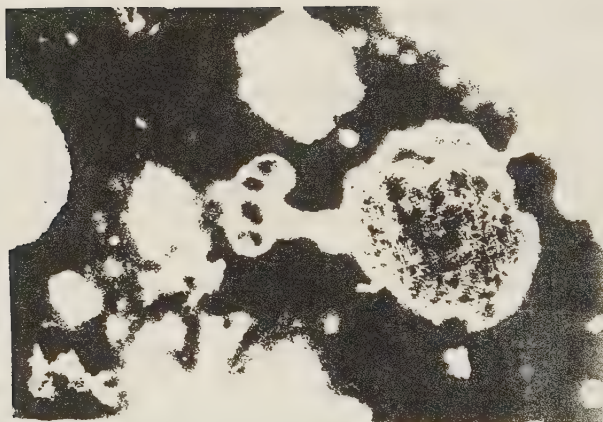


Abb. 5 Elektronenmikroskopische Darstellung von Virus 657
(100 000-fache Vergrößerung)

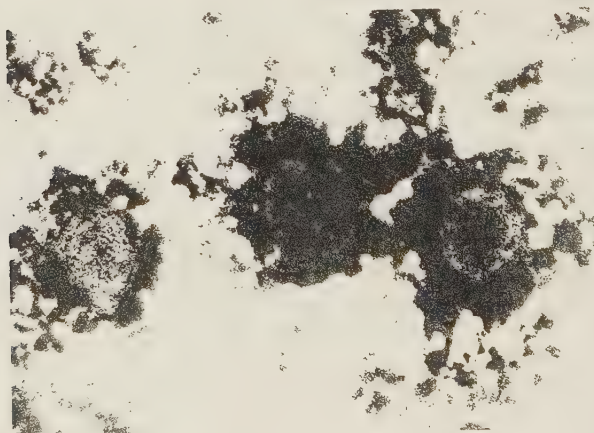


Abb. 6 Elektronenmikroskopische Darstellung von Virus 657
(20 000-fache Vergrößerung)

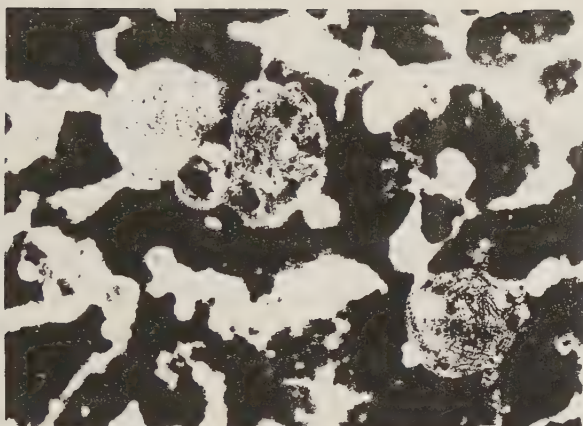


Abb. 7 Elektronenmikroskopische Darstellung eines größeren Viruspartikels von Isolat 657 (72 000-fache Vergrößerung)

4.3. Serologische Eigenschaften

4.3.1. Hämagglutinationshemmungstest

Die serologischen Beziehungen des Isolates 657 zu einigen aviären Paramyxoviren und zu Influenza A I vom Huhn wurden im Kreuz-HAH-Test geprüft.

Tabelle 9 zeigt die Untersuchungsergebnisse, die als reziproker Wert der letzten Serumverdünnungsstufe, die noch eine deutliche Hemmung der Hämagglutination bewirkte, ausgedrückt werden. Im homologen System war der Titer stets am höchsten. Auffallend war die enge und beiderseits ausgeprägte Verwandtschaft von Isolat 657 zum PMV-3 parakeet/Netherlands/449/75. Mit dem PMV-3 turkey/Wisconsin/68 bestand eine schwache asymmetrische Kreuzreaktion. Trotz wiederholter Untersuchungen konnten im HAH-Test keine serologischen Beziehungen zu Viren der übrigen PMV-Gruppen oder zu Influenza A I gefunden werden. Die getesteten Referenzstämme zeigten im übrigen die bekannten Kreuzreaktionen (siehe Tab. 1).

4.3.2. Agargelpräzipitationstest

Im AGP-Test konnten die zuvor ermittelten Resultate nicht in vollem Umfang überprüft werden, da ein Teil der Referenzseren nicht präzipitierte. Isolat 657 reagierte hier mit Seren gegen Parainfluenza II und parakeet/Netherlands/449/75 aber nicht mit ND-Antiseren. Positive Reaktionen mit präzipitierenden Antikörper gegen Influenza-, Adeno- und Reoviren vom Huhn sowie gegen Eulenherpesviren wurden nicht beobachtet. Bemerkenswert waren bei den daneben getesteten Referenzstämmen die stark ausgeprägten Präzipitationslinien zwischen dem budgerigar/Japan/Kunitachi/76 und allen ND-Stämmen.

Tabelle 9 Kreuz-HAH-Test einiger Paramyxovirusstämme gegen 657

Virusstämme	Immunseren gegen:														
	a	b	c	d	e	f	g	h	i	k	l	m	n	o	
a) NDV-Montana	<u>512</u> ¹⁾	256	256	- ²⁾	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	
b) NDV-Italien	256	<u>512</u>	128	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	
c) NDV-Myadera	512	512	<u>512</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	
d) finch/Bangor	-	-	-	<u>512</u>	32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
e) chicken/Yucaipa	-	-	-	128	<u>256</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
f) 657	-	-	-	-	-	<u>512</u>	-	64	-	-	-	-	-	-	
g) Turkey/Wisconsin	-	-	-	-	-	8	<u>64</u>	16	-	-	-	-	-	-	
h) parakeet/Netherl.	4	4	8	-	-	64	16	<u>512</u>	-	-	-	-	-	-	
i) duck/H.K./D3/75	-	-	-	-	-	-	-	-	<u>128</u>	-	-	-	-	-	
k) budgerigar/Kunitachi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<u>64</u>	-	-	-	-	
l) duck/H.K./199/77	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<u>128</u>	-	-	-	
m) pigeon/Otaru	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<u>1028</u>	16	-	
n) Parainfluenza II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<u>256</u>	-	
o) Influenza A I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	32	

1) reziproker Wert der Verdünnung, die noch 4 HA-Einheiten hemmt.

2) Wert liegt unter 2

4.3.3. Neutralisationstest

Im α -Test wurden alle Referenzstämme und deren korrespondierende Immunsereen hinsichtlich ihrer Verwandtschaft zum Isolat 657 geprüft. Die im HAH-Test gefundenen serologischen Beziehungen wurden weitgehend auch mit Hilfe der neutralisierenden Antikörper bestätigt. Schwache Kreuzreaktionen waren nicht mehr regelmäßig erfaßbar.

In Tabelle 10 wird das Verhalten des zu untersuchenden Isolates beschrieben. Mit den hier nicht berücksichtigten Viren trat keine Reaktion auf.

Tabelle 10 Kreuzneutralisationstest in der Zellkultur

Virusisolate	Immunsereen gegen				
	NDV-Italien	turkey/Wis	parakeet/Neth	657	Parainfluenza II
NDV Italien	9,5	-	-	-	-
turkey/Wisconsin	-	5,0	3,2	2,3 (35%)	-
parakeet/Netherlands	-	2,9	7,4	5,1 (80%)	-
657	-	2,0 (30%)	4,5 (70%)	6,1 (93%)	1,5
Parainfluenza II	-	-	-	-	4,8

Der in Tabelle 10 verwendete Neutralisationsindex bezeichnet die Differenz zwischen der mit und der ohne Serum ermittelten KID_{50} . Der Index war im homologen System am höchsten, es kam aber nie zur völligen Neutralisation. Viren mit einem Index größer als 2 werden als serologisch verwandt betrachtet. Die in der gleichen Tabelle für das Isolat aufgeführten Prozentzahlen veranschaulichen, daß die Verwandtschaft zum Parakeet-Virus sehr eng war. Der Index von turkey/Wisconsin war ein Grenzwert, das heißt, die serologische Beziehung zum Isolat 657 war nur schwach ausgeprägt.

Der Plaquereduktionstest, der als β -Test durchgeführt wurde, ergab vergleichbare Ergebnisse. So hemmte ein Immunsereum gegen parakeet/Netherlands

noch in einer Verdünnung von 1:64 die Ausbildung von Plaque durch das Isolat. Im homologen System erreichte eine Verdünnung von 1:256 das gleiche Resultat. Eine serologische Verwandtschaft zwischen dem untersuchten Wellensittich-Isolat und dem Parakeet-Virus ist als gesichert anzusehen.

4.4. Pathogenitätstest

4.4.1. Eintagsküken

Sieben von acht Eintagsküken erkrankten nach intrazerebraler Beimpfung mit Isolat 657 während der ersten drei Tage p.i. . Sie stellten die Futteraufnahme ein und zeigten schwere ZNS-Störungen wie Zittern, Torticollis und Lähmungen der Flügel und Ständer. Am fünften Beobachtungstag waren alle sieben kranken Küken tot. Das überlebende Tier zeigte keine klinischen Symptome und wurde acht Tage p.i. getötet. Dabei wurde Blut für die serologische Untersuchung gewonnen. Die beiden Kontrolltiere blieben während des gesamten Versuches unauffällig.

Bei der pathologisch-anatomischen Untersuchung zeigten die verendeten Tiere neben massiven Blutungen unter die Schädelkalotte und Gallenstau in der Leber keine weiteren Veränderungen. Das getötete Küken war in gutem Ernährungszustand und sonst ohne besonderen Befund.

Eine Rückisolierung des Virus aus Gehirn- und Organsuspensionen gestorbener Tiere gelang bereits bei der ersten AH-Inokulation in der Eikultur, während dies für das getötete Küken auch in der zweiten Passage nicht möglich war. Bakterien oder Pilze wurden in keinem Fall nachgewiesen.

Die Berechnung des ICP₁ ergab für das Isolat 657 einen Wert von 1,2. HAH-Antikörper gegen das Virus oder gegen NDV konnten im Serum des überlebenden Kükens nicht festgestellt werden.

4.4.2. Achtwöchige Hühner

Nur bei zwei der intranasal beimpften Tiere wurde am fünften und sechsten Tag p.i. gelegentliches Nießen beobachtet. Im übrigen blieben die achtwöchi-

gen Versuchshühner während des gesamten Beobachtungszeitraums frei von klinischen Symptomen. Drei Wochen p.i. wurden alle Tiere getötet und Blut für serologische Tests gewonnen.

Pathologisch-anatomisch fielen sowohl bei den primär infizierten Hühnern als auch bei den Kontakttieren petechiale Blutungen in der zäkalen Tonsille auf. Weitere Befunde konnten nicht erhoben werden.

Histologisch wurde bei den drei intranasal beimpften Hühnern eine interstielle Pneumonie nachgewiesen. Dabei wurden mantelförmig um die Primär- und Parabronchien gelagerte Infiltrate aus zahlreichen Lymphozyten, Histiozyten und Plasmazellen beobachtet. Die in der Umgebung der Bronchien anzutreffenden Lymphknötchen waren doppelt so groß wie bei den gesunden Tieren. In der Trachea wurden Hyperämie der Schleimhaut und lokale Epithelzellhyperplasie gefunden.

Bei einem intranasal infizierten Tier konnte im Stammhirn eine geringgradige perivaskuläre Vermehrung von Adventitiazellen festgestellt werden.

Bei allen Tieren bestand eine ausgeprägte Hyperplasie der zäkalen Tonsillen mit Extravasaten und oberflächlichen Ulzera, die zum Teil schon in Heilung begriffen waren.

Eine Virusisolierung aus Gehirn oder anderen Organen der Versuchstiere gelang auch in der zweiten Eikultur-Passage nicht. Bakteriologische und mykologische Untersuchungen waren negativ. Im Serum wurden aber HAH-Titer zwischen 1:32 und 1:128 für das Isolat 657 bestimmt. Mit ND-Stämmen reagierte das Serum der Hühner hingegen nicht.

4.4.3. Wellensittiche

Aufgrund der Anamnese war eine Empfänglichkeit von Wellensittichen für das untersuchte Virus zu erwarten. Nach experimenteller Infizierung oder Kontakt mit Isolat 657 blieben jedoch alle Versuchstiere frei von klinischen Symptomen. Sie zeigten während der gesamten Beobachtungszeit weder Störungen der Futteraufnahme noch eine Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens. Lediglich ein Wellensittich fiel durch vergrößerten Bauchumfang und träges

Verhalten beim Einfangen auf. 28 Tage p. i. wurden die Vögel getötet. Dabei wurde Blut zur serologischen Überprüfung entnommen.

Bei der pathologisch-anatomischen Beurteilung wurde ein guter Ernährungszustand aller Tiere festgestellt. Besondere Befunde wurden bei vier Wellensittichen erhoben. Bei einem der intramuskulär infizierten Vögel waren eine hochgradig vergrößerte Leber, eine ausgeprägte Adipositas und eine Nierendegeneration bemerkenswert. Dieses Tier war bereits zuvor durch sehr ruhiges Verhalten aufgefallen. Histologisch konnte in diesem Fall ein Gallengangsadenokarzinom sowie eine schwere interstitielle Nephritis mit herdförmigen Nekrosen diagnostiziert werden.

Drei der intranasal beimpften Vögel wiesen Blutungen in der pneumatisierten Spongiosa des Schädeldaches auf. In zwei dieser Fälle wurden zwischen Dura mater und innerer Menninx vereinzelte Zellinfiltrate gefunden, die aus Lymphozyten und Histiozyten bestanden. Auch unter der inneren Menninx konnten solche Infiltrate im Bereich von Kleinhirn und Ventrikelependym nachgewiesen werden.

In Lunge, Leber und Gehirn aller getöteten Wellensittiche lag eine ausgeprägte kapilläre Blutfülle vor.

Die Rückisolierung des Virus in der Eikultur gelang mit Material aus dem Lebertumor ebenso wie aus Gehirn- und Organmaterial von beiden Vögeln mit histologischen Veränderungen der Gehirnhäute. Die Verimpfung von Organsuspensionen der übrigen Tiere ergab auch in der zweiten Passage kein positives Ergebnis. Bakterien oder Pilze wurden nicht nachgewiesen.

HAH-Antikörper gegen das Isolat 657 fanden sich weder im Serum infizierter Wellensittiche noch bei den Kontakttieren.

Tabelle 11 faßt alle Ergebnisse der Pathogenitätsuntersuchung zusammen.

Tierzahl, Alter Infektionsweg Dosis	Klinik	Zeitpunkt des Todes	Pathologie Histologie	Virus- Reisolierung	HAH-Titer
8 Eintagsküken intrazerebral 0,05 ml 6,8 log 10 ELD ₅₀ /ml	Anorexie ZNS-Störungen Torticollis, Zittern, Lähmungen	1-5 Tage p. i. <u>1 Tier 8 Tage p. i. getötet</u>	Blutungen unter die Schädelkalotte <u>Gallenstau in der Leber</u> o. b. B.	positiv überlebendes Tier: negativ	— negativ
2 Kontroll Eintagsküken 0,05 ml NaCl, intrazerebral	o. b. B.	—	—	—	—
4 Hähne 8 Wochen intranasal 2 ml 6,8 log 10 ELD ₅₀ /ml 1 Henne 8 Wochen Kontakt	gelegentliches Niesen sonst o. b. B.	21 Tage p. i. getötet	Interstitielle Pneumonie, Hyperämie der Trachealschleimhaut Hyperplasie und Blutungen in der Zäkaltonsille	negativ	1:32 1:64
4 Hähne 8 Wochen intramuskulär 2 ml 6,8 log 10 ELD ₅₀ /ml 1 Henne 8 Wochen Kontakt	o. b. B. o. b. B.	21 Tage p. i. getötet	Hyperplasie und Blutungen in der Zäkaltonsille	negativ	1:64 1:128
4 Wellensittiche adult intranasal 1 ml 6,8 log 10 ELD ₅₀ /ml 1 Wellensittich adult Kontakt	o. b. B. o. b. B.	28 Tage p. i. getötet	3 Tiere: Blutungen in der Spongiosa des Schädeldaches, Meningitis o. b. B.	2 Tiere positiv andere negativ	negativ
4 Wellensittiche adult intramuskulär 1 ml 6,8 log 10 ELD ₅₀ /ml 1 Wellensittich adult Kontakt	o. b. B. 1 Tier Umfangsvermehrung des Abdomens	28 Tage p. i. getötet	o. b. B. Gallengangsenokarzinom, Nephritis, Adipositas	negativ 1 Tier positiv	negativ negativ

Das aus Organhomogenisat eines verendeten Wellensittichs gewonnene Isolat 657 konnte sowohl in Ei- als auch in Zellkulturen gezüchtet werden. Eine AH- oder DS-Inokulation führte allerdings erst in der zweiten Passage im embryonierten Hühnerei regelmäßig zum Tod der Embryonen. Unabhängig vom Impfmodus traten petechiale Blutungen in der Haut, Stauungsblutfülle aller Organe und Blutungen unter die Schädelkalotte auf. Nur die CAM-Inokulation, der nicht immer ein Embryotod folgte, bewirkte eine geringgradige Veränderung der Eihäute. Die EID_{50} ($8,5 \log_{10}/ml$) war bei AH-Inokulation höher als die ELD_{50} ($6,8 \log_{10}/ml$). Die mittlere Todeszeit lag bei 80 Stunden p.i. . An Hühnereier adaptiertes Virus verursachte in embryonierten Enten- und Gänse-eiern nicht regelmäßig einen Embryotod. Die hier beobachteten pathologisch-anatomischen Veränderungen entsprachen weitgehend dem oben geschilderten Befund.

Der von Isolat 657 hervorgerufenen CPE war in Küken- und Schweinenierenzellen ausgeprägter als in FHE-Kulturen. In allen Zellsystemen wurde eine deutliche Hämadsorption festgestellt. Synzytialzellen mit Kern- und Zytoplasmavakuolen traten regelmäßig auf. Einschußkörperchen wurden hingegen nicht gefunden. Ein Wachstum in Entenembryofibroblasten konnte auch mit Hilfe der Hämadsorption nicht nachgewiesen werden. In FHE-Kulturen rief das Virus spontan kleine lytische Plaques hervor.

In-vitro Untersuchungen charakterisierten Isolat 657 als behülltes, hitze- und säureempfindliches RNS-Virus mit thermolabilen Hämagglutinin. Es agglutinierte Erythrozyten verschiedener Säuger- und Vogelspezies und entsprach hinsichtlich Hämagglutinationsmuster und Elutionsgeschwindigkeit nur dem Virus parakeet/Netherlands/449/75. Ferner wurde nachgewiesen, daß das Virus Hühnerythrozyten hämolysiert und über eine Neuraminidase verfügt. Isolat 657 besitzt also alle wesentlichen Eigenschaften eines Paramyxovirus.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigten diese Zuordnung.

Partikel von helikaler Innenstruktur waren von einer Hülle mit deutlich sichtbaren Spikes umgeben. Der mittlere Durchmesser der Virionen betrug 240 nm.

Sowohl im HAH-Test als auch im SN- und AGP-Test wurde eine sehr enge Antigen-Verwandtschaft von Isolat 657 und parakeet/Netherlands/449/75 nachgewiesen. Mit dem Virus turkey/Wisconsin/68 (PMV-3)

und einem Parainfluenza II Subtyp vom Huhn kam es nur zu schwachen, asymmetrischen Kreuzreaktionen im HAH- und AGP-Test. Zum NDV und zu Vertretern der anderen Paramyxovirus-Serogruppen bestand keine Antigen-Verwandtschaft. Zusammengefaßt rechtfertigen die oben beschriebenen Untersuchungsergebnisse die Einordnung des neuen Isolates in die Serogruppe PMV-3.

Hinsichtlich individueller Eigenschaften ergaben sich weitere Übereinstimmungen mit dem Parakeet-Virus. Auf die identischen Hämagglutinationsmuster wurde bereits hingewiesen. Auch die Hitzelabilität der Infektiosität und des Hämagglutinins ist ein gemeinsames Merkmal beider Viren. Abweichend vom Verhalten des Parakeet-Virus konnte für Isolat 657 kein Wachstum in Entenembryofibroblasten festgestellt werden (SMIT u. RONDHUIS, 1976). Auffällige Embryopathien und Grünfärbung der AAF, wie sie für das Parakeet-Virus beschrieben wurden (SMIT u. RONDHUIS, 1976), wurden ebensowenig nachgewiesen wie die für dieses Isolat typischen Antigen-Beziehungen zum NDV. Die geringfügig divergierenden Werte, die für die Neuraminidasestabilität gemessen wurden, dürfen nicht überbewertet werden, da entsprechende Angaben verschiedener Autoren für die gleichen Virusstämme oft erheblich voneinander abweichen (ALEXANDER, 1980).

Zur genaueren serologischen Abgrenzung von Isolat 657 und parakeet/Netherlands/449/75 ist eine Untersuchung im Neuraminidasehemmtest erforderlich, die im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt wurde.

In-vivo wurde eine Pathogenität von Virus 657 für Eintagsküken festgestellt, von denen sieben von acht nach intrazerebraler Infizierung unter ausgeprägten ZNS-Störungen verendeten. MDT und ICPI (1,2) entsprachen den Werten mesogener ND-Stämme. Diese Eigenschaften wurden bisher bei nicht mit dem NDV verwandten Paramyxoviren nur in der Serogruppe PMV-3 festgestellt.

Bei acht Wochen alten SPF-Hühnern haftete Virus 657 nach intranasaler und intramuskulärer Infizierung sowie nach Kontaktinfektion. Es löste aber klinisch

nur vorübergehende, leichte respiratorische Erscheinungen (Nießen) aus. Bei der Tötung der Tiere nach 21 Tagen bestanden noch Blutungen und abgeheilte Ulcera in den zäkalen Tonsillen, wie sie bei NDV- aber auch bei Adenovirusinfektionen angetroffen werden können. Histologisch waren auch noch Reste einer herdförmigen, vor allem in der Nähe der Bronchien angesiedelten, interstitiellen Pneumonie feststellbar. Folglich war es durch die Infektion zu einer herdförmigen Erkrankung der Lungen gekommen. Solche Veränderungen führen beim Vogel, wenn sie nicht großflächig auftreten, nicht zu deutlichen klinischen Symptomen. Eine Rückisolierung des Virus gelang nicht mehr, da die Infektion schon zu lange zurücklag. Isolat 657 induzierte aber bei allen Versuchstieren eine ausgeprägte Antikörperbildung.

Die experimentelle Infizierung (intranasal, intramuskulär und durch Kontakt) rief bei adulten Wellensittichen keine klinischen Symptome hervor. Leider stehen noch keine SPF-Wellensittiche für Übertragungsversuche zur Verfügung. Da der Wellensittich generell ein schlechter Antikörperbildner ist (LÜTHGEN, 1981), kann auch durch eine serologische Untersuchung nicht geprüft werden, inwieweit bereits Auseinandersetzungen mit Paramyxovirusinfektionen stattgefunden haben. Kot der Versuchstiere sowie Organmaterial einiger getöteter Tiere wurden vor der in-vivo Testung virologisch untersucht. Trotz negativer Ergebnisse kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, daß die Vögel latente Virusträger waren. Daher kann die Feststellung einer fehlenden Pathogenität für den Wellensittich hinsichtlich Isolat 657 nur unter Vorbehalt getroffen werden. Das Virus hatte sich jedenfalls nach experimenteller Infizierung in den Versuchstieren vermehrt und konnte bei drei von zehn Vögeln noch nach 28 Tagen rückisoliert werden. Im HAH-Test konnten allerdings bei keinem der Tiere Antikörper nachgewiesen werden.

Da Lebertumoren, vor allem Gallengangsadenokarzinome, beim Wellensittich außerordentlich häufig vorkommen, war diese bei einem Tier beobachtete Veränderung als Zufallsbefund zu werten. Auch Blutungen in die pneumatisierte Spongiosa des Schädeldaches werden bei vielen Krankheitszuständen dieser Tierart diagnostiziert. Mit der experimentell ausgelösten Virusinfektion konnten allenfalls die histologisch nachgewiesenen Meningitiden in

Zusammenhang gebracht werden. Diese Veränderungen waren aber zu geringfügig, um wahrnehmbare klinische Symptome hervorzurufen.

Die Apathogenität des Isolates mag überraschend erscheinen, wenn man bedenkt, daß im Ursprungsbestand, aus dem das Virus isoliert wurde, ein Massensterben von Wellensittichen aufgetreten war. Die vorliegenden Ergebnisse sprechen dafür, daß das untersuchte Isolat allenfalls einer der auslösenden Faktoren gewesen ist. Daß in gesunden Zier- und Wildvogelpopulationen eine Reihe von Viren über kürzere oder längere Zeit nebeneinander vorkommen können, ist bekannt (GERLACH, 1979). Ein Zusammentreffen mehrerer Virusinfektionen kann dann - mit oder ohne Unterstützung ungünstiger Umweltfaktoren - zum Auftreten seuchenartiger Erkrankungen führen.

Aus dem Ursprungsbestand sind neben Isolat 657 mehrere dem VVNDV zugeordnete Paramyxoviren sowie Herpesviren isoliert worden. Die o.g. ND-Stämme sind für Wellensittiche hochpathogen (LÜTHGEN, 1981). Auch die Bedeutung der Herpesviren hinsichtlich der Verluste im Bestand darf nicht unterschätzt werden.

Die Ergebnisse des Pathogenitätstests bei Eintagsküken und achtwöchigen Hühnern unterstreichen die nahe Verwandtschaft von Isolat 657 und parakeet/Netherlands/449/75. Insoweit ist von Bedeutung, daß auch das Parakeet-Virus nach Beobachtungen von SMIT u. RONDHUIS (1976) bei Wellensittichen keine Erkrankungen hervorgerufen hat.

Die Resultate aller im Rahmen der vorgelegten Arbeit durchgeführten Untersuchungen ermöglichen, Isolat 657 als Paramyxovirus zu charakterisieren und vorläufig in die Gruppe PMV-3 einzuordnen. Gemäß der derzeit gültigen Nomenklaturregelung (WHO EXPERT COMMITTEE, 1971) wird für das Virus folgende Bezeichnung vorgeschlagen:

budgerigar/Munic/657/79.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist ein hämagglutinierendes Virus, das von einem verendeten Wellensittich isoliert und mit der Zahl 657 bezeichnet worden ist.

Das Isolat weist die für Paramyxoviren charakteristischen Eigenschaften auf. Es wächst nach Adaptierung unabhängig von der Inokulationsmethode in embryonierten Hühner-, Enten- und Gänseeiern. Dort verursacht es regelmäßig wenig spezifische Veränderungen des Embryos, die sich in seltenen Fällen auch auf die Eihüllen erstrecken. Die mittlere Todeszeit für die Hühnerembryonen liegt bei 80 Stunden. Das Virus bewirkt in FHE-Kulturen, Küken- und Schweineinnereinzellen einen typischen CPE, der aus Riesenzellen und kleinen lytischen Plaques besteht. Zytoplasmatische Einschlüsse können nicht nachgewiesen werden.

Isolat 657 ist ein behülltes RNS-Virus und empfindlich gegen Hitze und Säureeinwirkung. Es zeigt ausgeprägte Neuraminidaseaktivität und deutliches Hämolysevermögen. Sein Hämagglutinationsmuster entspricht dem von parakeet/Netherlands/449/75.

Im elektronenmikroskopischen Bild dominieren durchschnittlich 240 nm große, pleomorphe Partikel mit helikaler Innenstruktur und Spikes auf der Hülle.

Die serologischen Untersuchungen, insbesondere HAH- und SN-Test, ergeben eine enge Antigen-Verwandschaft mit Virus 657 und parakeet/Netherlands/449/75 sowie schwache Kreuzreaktionen mit turkey/Wisconsin/68 und Parainfluenza II-Virus vom Huhn. Serologische Beziehungen zum NDV und zu anderen untersuchten aviären Paramyxoviren bestehen nicht.

Durch experimentelle Übertragung kann eine hohe Empfänglichkeit von Eintagsküken für das Virus nachgewiesen werden. Während die Eintagsküken die intrazerebrale Infektion in der Regel nicht überleben, bleiben acht Wochen alte Hühner und adulte Wellensittiche frei von klinischen Symptomen. Die beobachteten histologischen Veränderungen und die bei den Hühnern festgestellte Antikörperbildung belegen aber, obwohl eine Virusrückisolierung nicht in jedem Fall gelang, daß die Infektion gehaftet hat. Da eine primäre Pathogenität des

Isolates für den Wellensittich fehlt, ist davon auszugehen, daß weitere Faktoren für Krankheit und Tod des Wirtsvogels mitverantwortlich gewesen sind.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wird Virus 657 vorläufig der Gruppe PMV-3 zugeordnet und als budgerigar/Munic/657/79 bezeichnet.

7. SUMMARY

A hemagglutinating agent, isolated from a budgerigar with fatal disease, designated 657, was characterised in these studies.

The isolate shows all signs of a paramyxovirus.

The virus grows well in the allantoic cavity of 9-days-old fertile fowls' eggs. A growth in embryonated ducks' and geese eggs and by different ways of inoculation is also reported. The isolate caused the death of embryos within a mean time of 80 hours. Alterations of the embryo and its fetal membranes are quite unspezifisch.

In chick embryofibroblasts, chick kidney and pig kidney cells the virus produces typical cytopathogenic effects, consisting of syncytial cells and small plaque formations. Inclusion bodies cannot be found in the cells.

The hemagglutination pattern of isolate 657 with erythrocytes of several avian and mammalian origin seems to have the same characteristics as that of a virus designated parakeet/Netherlands/449/75. The isolate is a slow eluter and shows activity of neuraminidase and hemolysis.

The physico-chemical properties of the newly isolated agent as containing RNA and being not resistant against treatment with heat, acid, ether and chloroform proved its classification as a paramyxovirus.

Morphological investigations with negativ contrast electron microscopy reveals pleomorphic particles with a mean diameter of about 240 nm. Inside of the envelope with its spikes the intact helical nucleocapsid can be seen. In all serological tests in particular in the HI- and SN test the isolate shows a close relationship to PMV-3 parakeet/Netherlands/449/75 (serogroup PMV-3), and a lower one to turkey/Wisconsin/68 and a parainfluenza II subtype. No cross-reaction can be observed with the NDV and paramyxoviruses of the other serogroups.

Following experimental infections of one-day-old chicks, eight-weeks-old chickens, and mature budgerigars different susceptibility is observed. Except one animal all one-day-old chicks died after intracerebral infection

within five days showing nerval symptoms. Older chickens and budgerigars developed no clinical signs.

Due to the histological lesions and the immune response of the chickens, it is to conclude that an infection took place. Because there is no primary pathogenicity for budgerigars, the isolate could not have been the only reason for death of the origin host.

On the basis of the presented results the virus 657 seems to be a member of the PMV-3 serogroup, and the following designation is suggested:

budgerigar/Munic/657/79.

LITERATURVERZEICHNIS

- ALEXANDER, D.J. (1974)
Comparison of the neuraminidases of three avian paramyxoviruses
Ach.ges. Virusforsch. 44, 28-34
- ALEXANDER, D.J. (1980)
Avian paramyxoviruses
The Veterinary Bulletin Vol. 50, No. 9
- ALEXANDER, D.J., AYMARD, M., KESSLER, N. & COLLINS, M.S. (1979)
Antigenic and structural relationships between avian paramyxoviruses isolated from ducks in Hong Kong and Mississippi, U.S.A.
J. gen. Virol. 44, 839-842
- ALEXANDER, D.J. & CHETTLE, N.J. (1978)
Relationship of parakeet/Netherlands/449/75 virus to other avian paramyxoviruses
Res. vet. Sci. 25, 105-106
- ALEXANDER, D.J., CHETTLE, N.J. & PARISON, G. (1979)a
Resistance of chickens to challenge with the virulent Herts 33 strain of Newcastle disease virus induced by prior infection with serologically distinct avian paramyxoviruses
Res. vet. Sci. 26, 198-201
- ALEXANDER, D.J. & COLLINS, M.S. (1981)
The structural polypeptides of Avian Paramyxoviruses
Arch. Virol. 67, 309-323
- ALEXANDER, D.J., HEWLETT, G., REEVE, P. & POSTE, G. (1973)
Studies on the cythopathic effects of Newcastle disease virus
the cythopathogenicity of strain Herts 33 in five cell types
J. gen. Virol. 21, 323-337
- ALEXANDER, D.J., REEVE, P. & ALLAN, W.H. (1970)
Characterisation and biological properties of the neuraminidase of strains of ND virus which differ in virulence
Microbios 2, 155-165
- ALEXANDER, D.J., SHORTRIDGE, K.F., COLLINS, M.S. & CHETTLE, N.J. (1979)b
Properties of newly isolated serologically distinct avian paramyxovirus
Arch. Virol. 60, 105-113

- ALEXANDER, D.J., SPACKMAN, D., ALLAN, W.H. & BORLAND, L. (1979)
Isolation of Newcastle disease virus from a wild mallard duck
(*Anas platyrhynchos*)
Vet. Rec. 105, 328-329
- ARIAS-IBARRONDO, J., MIKAMI, T., YAMAMOTO, H., FURUTA, Y.,
ISHIOKA, S., OKADA, K. & SATO, G. (1978)
Studies on the paramyxovirus isolated from Japanese sparrow-
hawks (*Accipiter virgatus gularis*)
I. Isolation and characterisation of the virus
Jap. J. vet. Sci. 40, 315-323
- ASHTON, W.L.G. & ALEXANDER, D.J. (1980)
A two year survey on the control of the importation of captive
birds into Great Britain.
Vet. Rec. 106, 80-83
- AYMARD HENRY, M., COLEMAN, M.T., DOWDLE, W.R., LAVER, W.G. &
WEBSTER, R.G. (1973)
Influenza virus neuraminidase and neuraminidase inhibition test
procedures.
Bull. Wld. Hlth. Org. 48, 199-202
- BANKOWSKI, R.A. (1964)
Cytopathogenicity of ND virus. In "Newcastle disease virus,
an involving pathogen", edited by R.P. Hanson
Univ. Wisconsin Press, Madison pp. 231-246
- BANKOWSKI, R.A. (1965)
Tissue-culture systems with Newcastle disease virus and
relationship of antigenicity to immunogenicity among strains
Avian Dis. 9, 157-170
- BANKOWSKI, R.A. & CORSTVET, R. (1961)
Isolation of a hemagglutinating agent distinct from Newcastle
disease from respiratory tract of chickens
Avian Dis. 5, 253-269
- BANKOWSKI, R.A., CORSTVET, R.E. & CLARK, G.T. (1960)
Isolation of an unidentified agent from the respiratory tract
of chickens
Science 132, 292-293
- BANKOWSKI, R.A., CONRAD, R.D. & REYNOLDS, B. (1968)
Avian influenza A and paramyxoviruses complicating respira-
tory disease diagnosis in poultry
Avian Dis. 12, 259-278

- BEACH, J.R. (1944)
The neutralisation in vitro of avian pneumoencephalitis virus
by Newcastle disease immune serum
Science 100, 361-362
- BROSTROM, M.A., BRUENING, G. & BANKOWSKI, R.A. (1971)
Comparison of neuraminidases of paramyxoviruses with
immunologically dissimilar hemagglutinins
Virology, 46, 856-865
- COLLINGS, D.F., FITTON, J., ALEXANDER, D.J., HARKNESS, J.W. &
PATTISON, M. (1975)
Preliminary characterisation of a paramyxovirus isolated
from a parrot
Res. vet. Sci. 19, 219-221
- DINTER, Z., HERMODSSON, S. & HERMODSSON, L. (1964)
Studies on myxovirus Yucaipa: its classification as a member
of the paramyxovirus group
Virology 22, 297-304
- DOYLE, T.M. (1927)
A hitherto unreported disease of fowls due to a filter-passing
virus
J. comp. Path. 40, 144-169
- ERICKSON, G.A., GUSTAFSON, G.A., PEARSON, J.E., MILLER, L.D.,
PROCTOR, S.J. & CARBREY, E.A. (1975)
Velogenic viscerotropic Newcastle disease in selected
captive avian species
Am. Assoc. Zoo. Vet. Annu. Proc., 133-136
- ERICKSON, G.A., MARE, C.J., GUSTAFSON, G.A., MILLER, L.D.,
PROCTER, S.J. & CARBREY, E.A. (1977)
Interaction between VVND and pet bird of six species:
I. Clinical and serological responses and viral excretion.
II. Viral evolution through bird passage
Avian Dis. 21, 642-669
- ERICKSON, G.A., MARE, C.J., GUSTAFSON, G.A., MILLER, L.D.,
PROCTER, S.J. & CARBREY, E.A. (1978)
Epizootologic aspects of viscerotropic velogenic Newcastle
disease virus in six pet birds species
Am. J. vet. Res. 39, 105-107
- FENNER, F. (1976)
The classification and nomenclature of viruses
Intervirol. 6, 1-12

- FLEURY, H.J.A. (1978)
First isolation of a Yucaipa-like virus in Africa
Avian Dis. 22, 196-197
- FLEURY, H.J.A. & ALEXANDER, D.J. (1979)
Isolation of twenty-three Yucaipa-like viruses from
616 wild birds in Senegal, West Africa
Avian Dis. 23, 742-744
- FLEURY, H.J.A. & ALEXANDER, D.J. (1978)
Paramyxovirus Yucaipa
Bull. Inst. Past. 76, 175-186
- GERLACH, H. (1979)
Vögel als Reservoir und Verbreiter von Krankheitserregern
Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 92, 169-173
- GOMEZ-LILLO, M., BANKOWSKI, R.A. & WIGGINS, A.D. (1974)
Antigenic relationship among viscerotropic velogenic
and domestic strains of Newcastle disease virus
Am. J. vet. Res. 35, 471-475
- HANSON, R.P. (1973)
Research support for eradication of viscerotropic velo-
genic Newcastle disease and other diseases
J. Am. Vet. Med. Assoc. 163, 1094-1098
- HANSON, R.P. (1974)
The remergence of Newcastle disease
Adv. Vet. Sci. Comp. Med. 18, 213-229
- HANSON, R.P. (1975)
Newcastle disease. In "Isolation and identification of avian
pathogens", edited by S.B. Hitchner et al.
American Association of Avian Pathologists
Arnold Printing Co., Ithaca pp. 160-173
- HANSON, R.P., (1978)
Newcastle disease. In "Diseases of poultry", edited by
M.S. Hofstad et al. State Univ. Press, Ames,
Iowa 7th edition pp. 513-535
- HANSON, R.P., SPALATIN, J. & JACOBSON, G.S. (1973)
The viscerotropic pathotype of Newcastle disease virus
Avian Dis. 17, 354-361
- HITCHNER, S.B. & HIRAI, K. (1979)
Isolation and growth characteristics of psittacine viruses
in chicken embryos
Avian Dis. 23, 139-147

- HIRAI, K. HITCHNER, S.B. & CALNEK, B.W. (1979)
 Characterisation of paramyxo-, herpes-, and orbiviruses
 isolated from psittacine birds
Avian Dis. 23, 148-163
- HORZINEK, M. (1975)
 Compendium der allgemeinen Virologie.
 Paul Parey Verlag, Berlin
- ISACHENKO, V.A., YAKHNO, M.A., OSIDZE, N.G. & SHEBOLDV, A.V. (1975)
 (Detection of a myxovirus of the Yucaipa group among agents causing respiratory disease in fowls)
Ekol. Virus. 3, 67-72
- KESSLER, N. & AYMARD, M. (1979)a
 Study of a new strain of paramyxoviruses isolated from wild ducks: structural polypeptides
J. gen. Virol. 43, 411-415
- KESSLER, N. & AYMARD, M. (1979)b
 Biochemical properties of paramyxovirus duck/Mississippi/75 neuraminidase
J. gen. Virol. 45, 745-749
- KESSLER, N., AYMARD, M. & CALVET, A. (1979)
 Study of a new strain of paramyxoviruses isolated from wild ducks: antigenic and biological properties
J. gen. Virol. 43, 273-282
- KIDA, H. & YANAGAWA, R. (1979)
 Isolation of a new avian paramyxovirus from a rock pigeon (*Columba livia*)
Zentralbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 245, 421-428
- KRANEVALD, F.C. (1926)
 (A poultry disease in the Dutch East Indies)
Ned. Ind. Bl. Diergeneesk 38, 448-451
- LANCASTER, J.E. (1977)
 Newcastle disease - a review of the geographical incidence and epizootiology
Wild poult. Sci. J. 155-165
- LANCASTER, J.E. & ALEXANDER, D.J. (1975)
 Newcastle disease: virus and spread. A review of some literature
 Monogr. No. 11, Canada Dep. Agric., Ottawa

- LANG, G., GAGNON, A. & HOWELL, J. (1975)
Occurance of paramyxovirus Yucaipa in Canadian poultry
Can. vet. J. 16, 233-237
- LIPKIND, M.A., WEISMAN, Y., SHIMANTER, E., SHODAM, D. & ARONOVICI, A. (1979)
The isolation of Yucaipa-like paramyxoviruses from epizootics of a respiratory disease in turkey poultry farms in Israel
Vet. Rec. 105, 577-578
- LÜTHGEN, W. & WACHENDÖRFER, G. (1970)
Newcastle Disease bei frisch importierten Großpapageien
Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 77, 407-408
- LÜTHGEN, W. (1973)
Spontane Newcastle Disease bei Zoo- und Ziervögeln
Erkrankungen der Zootiere 255-265
- LÜTHGEN, W. (1981)
Die Newcastle Krankheit bei Papageien und Sittichen
Verlag Paul Parey, Berlin, Fortschritte in der Veterinärmedizin 31
- MAYR, A., BACHMANN, P.A., BIBRACK, B. & WITTMANN, G. (1977)
Virologische Arbeitsmethoden I und II
Gustav Fischer Verlag, Jena
- McFERRAN, J.B., CONNOR, T.J., ALLEN, G.M. & ADAIR, B. (1974)
Studies on a paramyxovirus isolated from a finch
Arch. ges. Virusforsch. 46, 281-290
- McFERRAN, J.B., GORDON, W.A.M. & FINLAY, J.T.T. (1968)
An outbreak of subclinical Newcastle disease in N. Ireland
Vet. Rec. 82, 589-592
- MUSTAFAFFA-BABJEE, A. & SPRADBORROW, P.B. (1973)
Acute enteritis in Rainbow Lorikeets
Kajian Vet. 5, 16-19
- MUSTAFAFFA-BABJEE, A., SPRADBROW, P.B. & SAMUEL, J.L. (1974)
A pathogenic paramyxovirus from a budgerigar
Avian Dis. 18, 226-230
- NAKAYAMA, M., NEROME, K., ISHIDA, M., FUKUMI, H. & MORITA, A. (1976)
(Characterisation of virus isolated from budgerigar)
Med. Biol. 93, 449-454

- NEROME, K., NAKAYAMA, M., ISHIDA, M., FUKUMI, H. & MORITA, A. (1978)
Isolation of a new avian paramyxovirus from budgerigar
J. gen. Virol. 38, 293-301
- NUMAZAKI, A., SHIGETA, M., YANO, K., TAKAI, H. & ISHIDA, M. (1968)
A variant of parainfluenza II virus
Proc. Soc. exp. Biol. 127, 992-996
- NYMADAWA, P., KONSTANTINOW-SIEBELIST, I., SCHULZE, P. & STARKE, G. (1977)
Isolation of paramyxoviruses from free-flying birds of the order Passiformes in the German Democratic Republic
Acta virol. 21, 443
- PENNINGTON, T.H. (1978)
Antigenic differences between strains of ND virus
Arch. virol. 56, 345-351
- ROLLE, M. & MAYR, A. (1978)
Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart
- REED, L.J. & MÜNCH, H. (1938)
A simple method of estimating fifty percent endpoints
Am. J. Hyg. 27, 493-497
- SCHLOER, G.M. & HANSON, R.P. (1968)
Plaque morphology of Newcastle disease virus as influenced by cell type and environment factors
Am. J. vet. Res. 29, 883-895
- SCHLOER, G.M., SPALATIN, J. & HANSON, R.P. (1975)
Newcastle disease virus antigens and strain variations
Am. J. vet. Res. 36, 505-508
- SHORTRIDGE, K.F. & ALEXANDER, D.J. (1978)
Incidence and preliminary characterisations of hitherto unreported, serologically distinct, avian paramyxovirus isolated in Hong Kong
Res. vet. Sci. 25, 128-130
- SHORTRIDGE, K.F., ALEXANDER, D.J. & COLLINS, M.S. (1981)
Isolation and properties of viruses from poultry in Hong Kong which represent a new (sixth) distinct group of avian paramyxoviruses
J. gen. Virol. 50, 410-418

- SLEMONS, R.D., JOHNSON, D.C. & MALON, T.C. (1973)
Influenza Type A isolated from imported exotic birds
Avian Dis. 17, 485-489
- SMIT, T. & RONDHUIS, P.R. (1976)
Studies on a virus isolated from the brain of a parakeet
Avian Path. 5, 21-30
- SPALATIN, J., HANSON, R.P. & BEARD, P.D. (1970)
The hemagglutination elution patterns as a marker in
characterising Newcastle disease virus
Avian Dis. 14, 542-549
- STARKE, G., ALEXANDER, D.J., NYMADAWA, P. & KONSTANTINOW-
SIEBELIST, I. (1977)
Serological relationship between certain avian and animal
paramyxoviruses
Acta virol. 21, 502-506
- TUMOVA, B., ROBINSON, J.H. & EASTERDAY, B.C. (1979)b
A hitherto unreported paramyxovirus of turkeys
Res. vet. Sci. 27, 135-140
- TUMOVA, B., STUMPA, A., JANOUT, V., UVIZIL, M. & CHMELA, J.
(1979)a
A further member of the Yucaipa group isolated from the
common wren (*Troglodytes troglodytes*)
Acta virol. 23, 504-507
- WAGNER, K. & ENDERS-RUCKLE, G. (1966)
Ein im Hühnerei vorkommendes Parainfluenza-Virus
Zentralbl. Vet.Med. 13B, 215-218
- WAGNER, K. & KÖSTERS, J. (1965)
Zur Epidemiologie des Parainfluenza II Virus der Hühner
Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 72, 468-488
- WEBSTER, R.G. & CAMBELL, C.H. (1972)
An inhibition test for identifying the neuraminidase
antigen of influenza viruses
Avian Dis. 16, 1057-1066
- WEBSTER, R.G., MORITA, M., PRIDGEN, C. & TUMOVA, B. (1976)
Ortho- and paramyxoviruses from migrating feral ducks
characterisation of a new group of influenza A viruses
J. gen. Virol. 32, 217-225

WHO EXPERT COMMITTEE (1971)

A revised system of nomenclature for influenza viruses
Bull. Wld. Hlth. Org. 45, 119-124

WINTEROLL, G. (1976)

Newcastle Disease bei Greifen und Eulen
Der prakt. Tierarzt 2, 76-78

WOERNLE, H., BRUNNER, A. & MOSTAFA, M. (1971)

Zum Nachweis der Parainfluenza II Virusinfektion des Huhnes
Tierärztl. Umsch. 6, 304-315

LEBENS LAUF

Am 23. Januar 1952 wurde ich als Tochter der Eheleute Ernst und Herta Engelhard in Aschaffenburg geboren.

Dort wurde ich im September 1958 in die Dalberg-Schule aufgenommen. Nach vier Grundschuljahren wechselte ich zum neusprachlichen Gymnasium der Englischen Fräulein über. Die Reifeprüfung legte ich im Juni 1971 ab.

Im Oktober des gleichen Jahres nahm ich an der Ludwig-Maximilians-Universität München das Studium der Tiermedizin auf. Nach erfolgreich bestandener Staatsprüfung erhielt ich im Juli 1977 die Approbation als Tierärztin.

Von Januar 1978 bis September 1979 arbeitete ich als Assistenztierärztin in Baden-Württemberg.

Seit November 1979 bin ich mit der Anfertigung der vorgelegten Dissertation befaßt.

Frau Prof. Dr. I. Gylstorff bin ich für die Überlassung des Themas und die freundliche Beratung bei Durchführung der Arbeit zu besonderem Dank verpflichtet.

Frau Dr. Dr. habil. H. Gerlach danke ich für die Durchführung der bakteriologischen Untersuchungen.

Für die Ausführung der elektronenmikroskopischen Arbeiten danke ich herzlich Herrn Prof. Dr. H. Mahnel und Frau H. Preis vom Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät München.

Frau Dr. D. Kitzing gilt mein besonderer Dank für die Betreuung der Arbeit und die jederzeit gewährte Unterstützung.

Nicht zuletzt danke ich allen Mitarbeitern des Institutes für ihre Hilfsbereitschaft.

